

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-518339

(P2002-518339A)

(43) 公表日 平成14年6月25日 (2002.6.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 0 7 K 7/64		C 0 7 K 7/64	
A 6 1 K 38/00		A 6 1 K 49/00	A
49/00		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 3/10		25/00	
25/00		35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-554387(P2000-554387)  
(86) (22) 出願日 平成11年6月15日 (1999.6.15)  
(85) 翻訳文提出日 平成12年12月19日 (2000.12.19)  
(86) 国際出願番号 PCT/IL99/00329  
(87) 国際公開番号 WO99/65508  
(87) 国際公開日 平成11年12月23日 (1999.12.23)  
(31) 優先権主張番号 09/100, 360  
(32) 優先日 平成10年6月19日 (1998.6.19)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)  
(31) 優先権主張番号 09/203, 389  
(32) 優先日 平成10年12月2日 (1998.12.2)  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

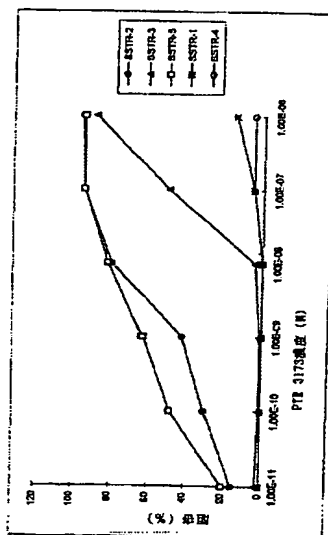
(71) 出願人 ベプター, リミテッド  
イスラエル国 76326 レボヴォット, キルヤット ヴィーズマン  
(72) 発明者 ホーニック, ヴェレド  
イスラエル国 76000 レボボット, ハードゥフ ストリート 5  
(72) 発明者 アファーガン, ミッシェル, エム.  
イスラエル国 43701 ラーナナ, パーイラン ストリート 28  
(72) 発明者 ゲラーマン, ギャリー  
イスラエル国 75436 リション レジオン, ヤハロン ストリート 45  
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コンフォメーション的に拘束された主鎖環化ソマトスタチン類似体

(57) 【要約】

ソマトスタチン受容体サブタイプ選択性を有する、コンフォメーション的に拘束された主鎖環化ソマトスタチン類似体である新規ペプチドが開示される。これらの受容体サブタイプ選択性のパターンにより、改善された治療上の有用性を有する化合物が提供される。該ソマトスタチン類似体の合成方法および該ソマトスタチン類似体のスクリーニング方法も開示される。さらに、ソマトスタチン類似体を含む医薬組成物およびかかる組成物の使用方法が開示される。



【請求項 1】 少なくとも 1 つのビルディング単位を組込んだ主鎖環化ソマトスタチン類似体であって、該ビルディング単位が、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドを含む架橋基に結合したペプチド主鎖の 1 個の窒素原子を含有し、該少なくとも 1 つのビルディング単位が該架橋基を介して結合して、第 2 のビルディング単位、該ペプチド配列のアミノ酸残基の側鎖または N 末端アミノ酸残基からなる群より選択される部分を有する環状構造を形成する、前記類似体。

[illegible]

式7

R<sup>1,2</sup> は、Gly、Val、Leu、(D)-もしくは(L)-Phe、または1NaIもしくは2NaIである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項3】 Qが水素であり、

R<sup>5</sup>がGABAであり、

R<sup>6</sup>がPheであり、

R<sup>7</sup>がTrpであり、

R<sup>8</sup>が(D)Trpであり、

R<sup>9</sup>がLysであり、

R<sup>10</sup>がThrであり、

R<sup>11</sup>がPheであり、

R<sup>12</sup>がGlyであり、

nが3であり、

Xがアミドである、請求項2に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項4】 Qがガラクトースであり、

R<sup>5</sup>がDabであり、

R<sup>6</sup>がPheであり、

R<sup>7</sup>が(L)-Trpであり、

R<sup>8</sup>が(D)-Trpであり、

R<sup>9</sup>がLysであり、

R<sup>10</sup>がThrであり、

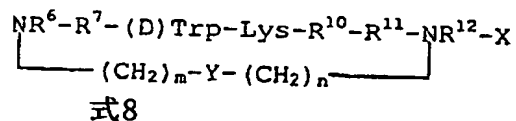
R<sup>11</sup>がPheであり、

R<sup>12</sup>がGlyであり、

nが3であり、

Xがアミドである、請求項2に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項5】 下記の一般式8



[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、  
 $R^6$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、  
 $R^7$ は、Tyr、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、  
 $R^{10}$ は、Thr、Val、Ser、またはCysであり、  
 $R^{11}$ は、Val、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、  
 $R^{12}$ は、Gly、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、  
Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項6】  $R^6$ が(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^7$ がTyrまたはPheであり、

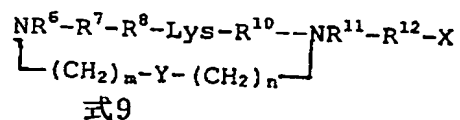
$R^{10}$ がThr、ValまたはSerであり、

$R^{11}$ がVal、1Nalまたは2Nalであり、

$R^{12}$ がGlyであり、

Yがアミドである、請求項5に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項7】 下記の一般式9



[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^6$ は、(D)-もしくは(L)-Phe、または(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、Tyrまたは(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^8$ は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-1Nalまたは(D)-もしくは(L)-2Nalであり、

$R^{10}$ は、Thr、Val、Ser、またはCysであり、

$R^{11}$ は、Glyまたは(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、Thr、GABA、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nalまたは(D)-

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

Yがアミドである、請求項7に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

$$\text{R}^4\text{-NR}^5\text{-R}^6\text{-R}^7\text{-R}^8\text{-R}^9\text{-R}^{10}\text{-NR}^{11}\text{-R}^{12}\text{-X}$$
  

$$\quad \quad \quad \left[ (\text{CH}_2)_m\text{-Y-}(\text{CH}_2)_n \right]$$

式10

R<sup>1</sup> は、Cys、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、結合、あるいはVal、Thr、1NaIまたは2NaIであり、

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項10】  $R^4$ が水素であり、

$R^5$ が(D)-もしくは(L)-Phe、または(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^6$ が結合、あるいは(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであり、

$R^7$ が(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであり、

$R^{10}$ が結合、あるいはThr、Valまたは(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{11}$ が(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ が結合である、請求項9に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項11】  $R^5$ が(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^6$ が結合、あるいは(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

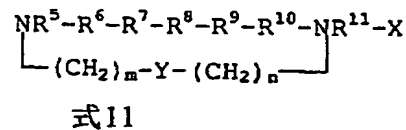
$R^7$ が(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{10}$ が結合、またはThr、Cys、(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^{11}$ がCys、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ が結合またはThrである、請求項10に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項12】 下記の一般式11



[式中、mおよびnは、1～5であり、

$R^5$ は、(L)-もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^6$ は、(L)-もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、存在しないか、あるいは(L)もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)もしくは(L)-Alaであり、

$R^6$  は、(D)-または(L)-Trpであり、

$R^9$  は、(D)-または(L)-Lysであり、

$R^{10}$  は、結合、あるいはThr、Val、Cysまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^{11}$  は、(L)もしくは(D)-Phe、Cys、または(D)-もしくは(L)-Alaであり、

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項13】  $R^6$  が(D)-もしくは(L)-Alaであり、

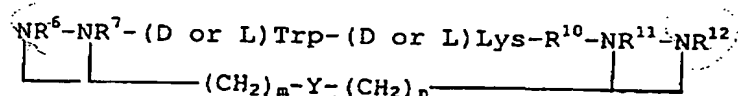
$R^7$  が結合または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{10}$  がThrであり、

$R^{11}$  がCysであり、

Xがアルコール基である、請求項12に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体

【請求項14】 下記の一般式12



式12

[式中、破線は、架橋が一端で $\text{NR}^6$ または $\text{NR}^7$ に結合し、かつ他端で $\text{NR}^{11}$ または $\text{NR}^{12}$ に結合していることを示し、

$R^6$  は、水素または(D)-もしくは(L)-PheまたはAlaであり、

$R^7$  は、(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであり、

$R^9$  は、Thr、Ala、ValまたはCysであり、

$R^{11}$  は、結合あるいは(D)-もしくは(L)-Phe、Ala、またはCysであり、

$R^{12}$  は、結合またはThrもしくはアルコールに還元されたThrであり、

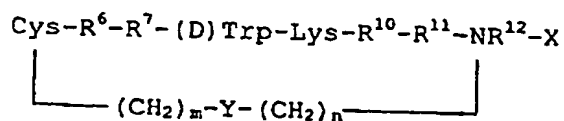
Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドであり、

好ましくは、前記架橋が $\text{NR}^6$ および $\text{NR}^{11}$ に結合しているか、または $\text{NR}^6$ および $\text{NR}^{12}$

(ここで $R^{12}$ はアルコールに還元されているThrである)に結合している]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項 15】 下記の一般式 13



式13

[式中、mおよびnは1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

R<sup>6</sup>は、(D)-もしくは(L)-PheまたはTyrであり、

R<sup>7</sup>は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、またはTyrであり、

R<sup>10</sup>は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

R<sup>11</sup>は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

R<sup>12</sup>は、Gly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

Yは、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項 16】 R<sup>6</sup>がPheであり、

R<sup>7</sup>がTrpであり、

R<sup>10</sup>がThrであり、

R<sup>11</sup>がPheであり、

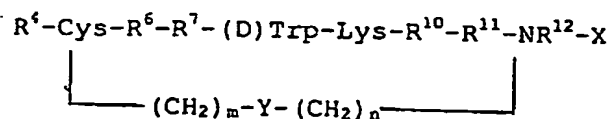
R<sup>12</sup>がGlyであり、

Yがジスルフィドである、請求項15に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体

。

【請求項 17】 下記の一般式 14





式14

[式中、 $m$ および $n$ は、1～5であり、

$X$ は、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^4$ は、(D)-もしくは(L)-PheまたはTyrであり、

$R^6$ は、(D)-もしくは(L)-PheまたはTyrであり、

$R^7$ は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1NaI、(D)-もしくは(L)-2NaI、またはTyrであり、

$R^{10}$ は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{11}$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^{12}$ は、Gly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$Y$ は、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項18】  $R^4$ が(D)Pheであり、

$R^6$ がPheであり、

$R^7$ がTrpであり、

$R^{10}$ がThrであり、

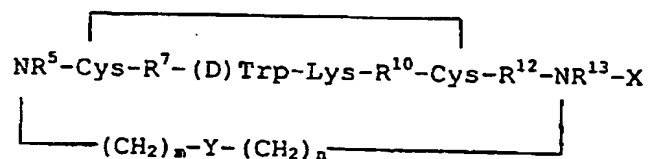
$R^{11}$ がPheであり、

$R^{12}$ がGlyであり、

$Y$ がジスルフィドである、請求項17に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体

。

【請求項19】 下記の一般式15



式15

[式中、 $m$ および $n$ は、1～5であり、

$X$ は、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^5$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、またはTyrであり、

$R^{10}$ は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、Gly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{13}$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$Y$ は、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項20】  $R^5$ がPheであり、

$R^7$ がPheであり、

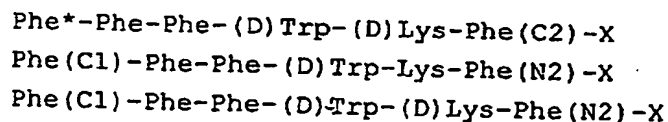
$R^{10}$ がThrであり、

$R^{12}$ がGly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{13}$ がPheであり、

$Y$ がアミドである、請求項19に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項21】 下記式



Phe(N2)-Tyr-(D)2Nal-Lys-Val-Gly(C2)-Thr-X  
 Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Gly(C2)-2Nal-X  
 Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Val-Gly(C2)-X  
 Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Ser-2Nal-Gly(C2)-X  
 Phe(N2)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-2Nal-Gly(C2)-X  
 GABA\*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X  
 Cys\*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X  
 Phe(C3)-Cys\*-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys\*-Phe-Phe(N3)-X  
 (D)Phe-Cys\*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X  
 ガラクトース-Dab\*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X

[式中、Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、星印(\*)は、架橋基がアミノ酸のN<sup>α</sup>-ω-官能化誘導体とペプチドのN末端もしくはCys残基の側鎖の間に結合していることを示す]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【請求項22】 少なくとも1つのビルディング単位を組み込んだ主鎖環化ソマトスタチン類似体(ただし、該ビルディング単位が、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドを含む架橋基に結合したペプチド主鎖の1個の窒素原子を含有し、該少なくとも1つのビルディング単位が該架橋基を介して結合して、第2のビルディング単位、該ペプチド配列のアミノ酸残基の側鎖またはN末端アミノ酸残基からなる群より選択される部分を有する環状構造を形成する)と、製薬上許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項23】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項2に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項24】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項5に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項25】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項7に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項26】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項9に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項27】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項12に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

ある、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項28】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項14に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項29】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項15に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項30】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項17に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項31】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項19に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項32】 前記ソマトスタチン類似体が、請求項21に記載のものである、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項33】 前記主鎖環化類似体が、1つのソマトスタチン受容体サブタイプに選択的である、請求項22に記載の組成物。

【請求項34】 前記主鎖環化類似体が、2つのソマトスタチン受容体サブタイプに選択的である、請求項22に記載の組成物。

【請求項35】 癌、自己免疫疾患、内分泌障害、糖尿病関連合併症、胃腸障害、炎症性疾患、膵炎、アテローム性動脈硬化症、再狭窄および術後疼痛からなる群より選択される障害の治療または予防方法であって、治療または予防を必要とする哺乳動物に、治療上有効量の請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体を含む医薬組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項36】 前記主鎖環化類似体が、1つのソマトスタチン受容体サブタイプに選択的である、請求項36に記載の方法。

【請求項37】 前記主鎖環化類似体が、2つのソマトスタチン受容体サブタイプに選択的である、請求項36に記載の方法。

【請求項38】 請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体を投与することを含む、癌の診断方法。

【請求項39】 前記主鎖環化類似体が、転移の存在を画像化するために用いられる、請求項38に記載の方法。

【請求項40】 前記主鎖環化類似体が、検出可能なプローブで標識される

、請求項 38 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の分野

本発明は、新規な結合を介して環化され、コンフォメーション的に拘束されたN<sup>o</sup>主鎖環化ソマトスタチン類似体、およびそれらを含む医薬組成物に関する。

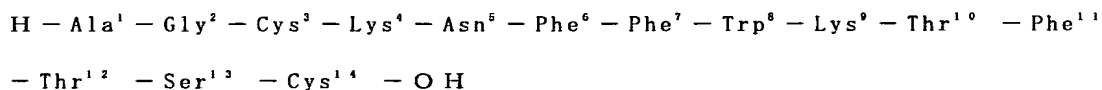
## 【0002】

発明の背景ソマトスタチン類似体

ソマトスタチンは、中枢神経系および周辺組織の両方に存在する環式テトラデカペプチドである。それは、最初に、哺乳類の視床下部から単離され、下垂体前葉製剤から成長ホルモン分泌物の重要な阻害剤として同定された。その複数の生物学的活性として、膵臓からのグルカゴンおよびインシュリンの分泌の抑制、ほとんどの消化管ホルモンの調節ならびに中枢神経系全体にわたる運動活性および認識過程に関与する他の神経伝達物質の放出の調節がある（概説としてLamberts, Endocrine Rev., 9:427, 1988を参照）。さらに、ソマトスタチンおよびその類似体は、様々な種類の腫瘍の治療に対して潜在的に有用な抗増殖剤である。

## 【0003】

下記構造：



を有する天然のソマトスタチン（ソマトトロピン放出阻害因子（SRIF）としても知られる）は、最初に、Guillemin および共同研究者（Bruzeau ら、Science, 179:78, 1973）によって単離された。このソマトスタチンは受容体のファミリーと相互作用することによってその効果を発揮する。近年、SSTR1~5と称する5つの受容体サブタイプが同定され、クローン化された。これらの受容体サブタイプの間の正確な機能の違いは、まだ完全には明らかにされていない。

## 【0004】

ソマトスタチンの天然形は、二つの望ましくない性質（生物学的利用能が小さく、作用の持続時間が短い）を示すので、治療剤としての使用は限られる。この

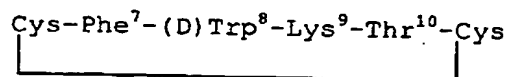
理由により、ここ 20 年間は、効力、生体安定性、作用の持続時間、または成長ホルモン、インシュリンもしくはグルカゴンの放出の抑制を考慮した選択性のいずれかが優れたソマトスタチン類似体を見い出すためにかなりの努力がなされている。

#### 【 0 0 0 5 】

構造－活性の関係の研究、円偏光二色性および核磁気共鳴などの分光学法、ならびに分子設計法から、次のことが分かる。すなわち、天然ソマトスタチンの環状部分のコンフォメーションは恐らく逆平行  $\beta$  シートであり；Phe<sup>6</sup> および Phe<sup>11</sup> が二つの芳香環の間の疎水的相互作用によるファーマコホアコンフォメーション (pharmacophore conformation) の安定化において重要な役割を果たし；逆平行  $\beta$  シートの  $\beta$  - ターンの周囲に広がる 4 個のアミノ酸 Phe<sup>7</sup> - Trp<sup>8</sup> - Lys<sup>9</sup> - Thr<sup>10</sup> がファーマコホアに必須であり；(D) Trp<sup>8</sup> の方が (L) Trp<sup>8</sup> よりも、ソマトスタチン受容体サブタイプ 2 ～ 5 との相互作用に好ましいということである。

#### 【 0 0 0 6 】

にもかかわらず、



で表されるジスルフィド架橋によって固定されたこれら 4 個のアミノ酸を含むヘキサペプチドソマトスタチン類似体は、in vitro および in vivo の両方においてほとんど不活性であるが、天然ソマトスタチンの Phe<sup>6</sup> - Phe<sup>11</sup> 疎水的相互作用が共有ジスルフィド架橋で置き換えられるという利点がある。

#### 【 0 0 0 7 】

このヘキサペプチドソマトスタチン類似体の活性を増加させるために、主要な 4 種類の方法が試みられている。すなわち、(1) ジスルフィド架橋を、シスアミド結合を刺激する環化、または二環式類似体を生じる分子への第二の環化により置き換える。どちらの場合も、得られる類似体のコンフォメーションの自由度は減少する。(2) Phe<sup>7</sup> - (D) Trp<sup>8</sup> - Lys<sup>9</sup> - Thr<sup>10</sup> の配列のものと残基を他の天然または非天然アミノ酸で置き換える、例えば、Phe<sup>7</sup> を Tyr<sup>7</sup> で、Thr<sup>10</sup>

を Val<sup>10</sup> で置き換える。(3) 天然のソマトスタチンの別の官能基を組み入れて、これらの新しい要素が受容体との相互作用に寄与するようにする。(4) そのような類似体はより選択性が高いと仮定して、4 個のアミノ酸 Phe<sup>7</sup> - (D) Trp<sup>8</sup> - Lys<sup>9</sup> - Thr<sup>10</sup> の一つを除去する。

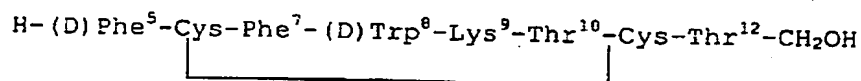
## 【 0 0 0 8 】

ソマトスタチン類似体 MK-678 :

シクロ (N-Me - Ala<sup>6</sup> - Tyr<sup>7</sup> - (D) Trp<sup>8</sup> - Lys<sup>9</sup> - Val<sup>10</sup> - Phe)  
は、上記の最初の 3 個の方法を使用して設計した、効力がかなり高いソマトスタチン類似体の一例である (Veber ら、Life Science, 34:371, 1984)。このヘキサペプチド類似体では、シス-アミド結合が N-Me - Ala と Phe<sup>11</sup> との間に位置し、Tyr<sup>7</sup> および Val<sup>10</sup> が各々、Phe<sup>7</sup> および Thr<sup>10</sup> と置き代わり、Phe<sup>11</sup> が天然のソマトスタチンから組み込まれる。

## 【 0 0 0 9 】

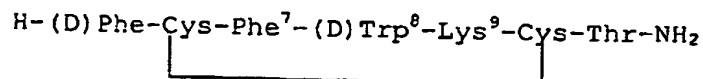
別のグループのソマトスタチン類似体 (米国特許 4,310,518 および 4,235,886) としては、オクトレオチド (Octoreotide) :



が挙げられ、これは、臨床的に利用できる最初に承認されたソマトスタチン類似体である。それは、上記の第三の方法を使用して開発された。この場合、(D) Phe<sup>5</sup> および還元された C-末端の Thr<sup>12</sup> - CH<sub>2</sub> OH は各々、天然の Phe<sup>6</sup> および Thr<sup>12</sup> が利用できるコンフォメーション的空間の一部を占有すると推定される。

## 【 0 0 1 0 】

化合物 TT-232 :





は、オクトレオチドに密接に関連し、上記の第四の方法を行う例である。Thr<sup>10</sup>の欠如が、恐らく、抗腫瘍活性に関する高い機能的選択性の一因である。

#### 【 0 0 1 1 】

これらの効力の高いソマトスタチン類似体の例は、6および11位のフェニルアラニンがファーマコホアコンフォメーション (pharmacophore conformation) の安定化において重要な役割を果たすだけでなく、受容体との相互作用において機能的役割を有することを示唆する。受容体との相互作用には一つのフェニルアラニン (Phe<sup>6</sup> または Phe<sup>11</sup>) で十分であるか、または両方が必要であるかどうかは、まだ解決していない問題である。

#### 【 0 0 1 2 】

現在、ソマトスタチン受容体は、5種類の異なる受容体サブタイプのファミリーを構成し (Bellおよび Reisine, Trends Neurosci., 16, 34-38, 1993)、それらは、組織特異性および/または生物活性に基づいて区別することができることが知られている。

#### 【 0 0 1 3 】

#### ソマトスタチン類似体の治療上の使用

それらの阻害性薬理学的特性によって、ソマトスタチン類似体を、ホルモン分泌性およびホルモン依存性腫瘍を有する患者の治療に使用することができる。現在のところ、転移性カルチノイド腫瘍に関連する症状 (潮紅、下痢、心弁膜疾患および腹痛) ならびに血管作用性腸管ペプチド (VIP) 分泌腺腫に関連する症状 (水様性下痢) は、オクトレオチドによって治療される。オクトレオチドは、重度の胃腸の出血および先端肥大症の治療に対しても認可されている。さらに、種々の腫瘍における高い親和性を有するソマトスタチン受容体の豊富な存在量によって、これらの腫瘍の視覚化のためにin-vivoにおける放射性標識ソマトスタチン類似体の使用が可能になる (Lambertsら, N. Engl. J. Med., 334:246 1996)。神経内分泌系腫瘍、特にカルチノイドおよびVIP産生腫瘍では、オクトレオチドはその活性因子の分泌および作用の両方を阻害する。したがって多量分泌性下痢を特徴とするVIP産生腫瘍では、ソマトスタチン類似体は、VIP分泌阻害により、また直接腸管分泌に影響を与えて、その下痢を低減させる。しかしながら、該

薬物に対する応答は、多くの場合、時間と共に低減するが、それはおそらく腫瘍細胞に対するソマトスタチン受容体のダウンレギュレーション、または受容体の陰性クローンの産生によるものだろう。一定の抗増殖作用がないことは、これらの腫瘍に見られるいくつかのソマトスタチン受容体サブタイプに対するオクトレオチドの乏しい親和性に関係している可能性がある。(Lambertsら、前掲)。

【 0 0 1 4 】

天然ソマトスタチンおよびオクトレオチドは、報告によると、神経内分泌系腫瘍に伴うもの以外の分泌性下痢症候を改善するものである。短腸症候群に伴う分泌性下痢、回腸フィステル形成性下痢、突発性分泌性下痢、アミロイドーシスに伴う下痢、および糖尿病性下痢の制御については既に報告されている。また両方の化合物は、AIDSに関連する難治性下痢の管理、特に同定可能な病原体をもたない患者において、ある程度の有望性が示された。当技術分野で公知のソマトスタチン類似体は、特に抗腫瘍剤として十分な選択性または受容体サブタイプ選択性を示すことはできない (ReubiおよびLaissue, TIPS, 16, 110-115, 1995)。

【 0 0 1 5 】

成長ホルモン放出を阻害するがインシュリン放出は阻害しない、2型および5型受容体に対するソマトスタチン類似体の選択性は、インシュリン非依存型糖尿病 (NIDDM) の治療に使用しうる可能性をひめている。インシュリンの末梢抵抗の低減および血糖制御の改善のため、グルカゴン放出阻害に対してより低い効力を有することが好ましい。

【 0 0 1 6 】

成長ホルモンは末梢におけるインシュリン受容体の直接アンタゴニストであり、成長ホルモン過剰産生はインシュリン末梢抵抗に付随するものである。成長ホルモンの主な生物学的シグナルであるIGFの上昇は、血管障害、網膜症および腎障害などの糖尿病性合併症に伴って起こる。腎障害は主要な糖尿病性血管障害の合併症の一つであり、糖尿病患者の末期腎不全および死の主因の一つである。糖尿病性および他の腎障害におけるGH-IGF軸の有意な改善の証拠が、いくつかの研究 (Flyvbjerg A. Kidney Int. S12-S19, 1997) により示されている。非肥満糖尿病性 (NOD) マウスにおける成長ホルモンの血清レベルの上昇は、ヒトにおいて

記載 (Landauら、J. Am. Soc. Nephrol. 8: A2990, 1997) された変化と類似していることが最近わかった。これらの知見により、糖尿病性網膜症における成長ホルモン-IGF軸の役割の解明、およびこれらの続発性糖尿病関連合併症におけるシマトスタチン類似体の潜在的な治療効果の試験が可能になる。

#### 【 0 0 1 7 】

##### 改良ペプチド類似体

受容体サブタイプに対してより大きな特異性を有するペプチド類似体を獲得することにより、増強された臨床選択性を達成することが望ましいだろう。

#### 【 0 0 1 8 】

有機化学および分子生物学の大きな進歩の結果、現在、多くの生物活性ペプチドを、薬剤および臨床用途に十分な量で製造することができる。すなわち、ここ2、3年で、ペプチドが関与している病気の処置および治療に対する新しい方法が確立されてきた。しかし、ペプチドの薬物としての使用は、次の要因により制限される。すなわち、a) 胃腸管および血清でのタンパク質分解に対する代謝安定性が低いこと、b) 経口摂取後の吸収が、特にその分子量が比較的高いか、もしくは特異的輸送系に欠けるか、またはその両方のために、悪いこと、c) 肝臓および腎臓を通過する排出が速いこと、およびd) ペプチド受容体は生物体に広く分布し得るので、標的としない器官系において所望しない副作用があることである。

#### 【 0 0 1 9 】

天然ペプチド分子の欠点を克服し、それにより改善された治療特性を示すコンホメーション的に拘束されたペプチド類似体を製造することが最も有益だろう。

#### 【 0 0 2 0 】

ペプチドのコンホメーションの拘束に対する新規の概念上の方法が、Gilonら (Biopolymers, 31:745, 1991) によって導入された。彼らは、ペプチドの主鎖-主鎖環化を提案した。この方法の理論的利点として、所与のペプチドの特異的受容体との相互作用に対して重要であり得る側鎖を妨害することなく、ペプチドの主鎖の炭素または窒素により環化を行うことができることが挙げられる。その概念は、興味のある直鎖状ペプチドに適用できるものとして意図されたが、実際

問題として、その提案された方法には、架橋基を介して結合すべきアミノ酸を置換するために使用されなければならない適当なビルディング単位の入手可能性という制限因子があった。主鎖環化のこの概念は、グリシン以外のアミノ酸のビルディング単位の実用的な製造法を見いだすことができないことにより、現実には実施できなかった (Gilon ら、J. Org. Chem., 587:5687, 1992)。

#### 【 0 0 2 1 】

さらに、Gilonおよび共同研究者ら (W0 95/33765およびW0 97/09344) による開示によって、主鎖環化ペプチド類似体の合成に必要なビルディング単位の製造法が提供された。最近、ソマトスタチン活性を有する主鎖環化ペプチド類似体を製造するための、これらの方法の成功的使用についても開示された (W0 98/04583)。これらの方法はすべて、参照によりその全文を本明細書に組み入れる。

#### 【 0 0 2 2 】

改善された治療選択性を有する、本明細書に開示されるソマトスタチン類似体を教示または示唆した背景技術はない。

#### 【 0 0 2 3 】

#### 発明の概要

本発明により、 $\alpha$ アミノ酸の $\alpha$ 窒素に架橋基が結合した新規のビルディング単位を組み入れたことを特徴とする新規のペプチド類似体が生成された。具体的に説明すると、これらの化合物は、4~24アミノ酸のペプチド配列を含む主鎖環化ソマトスタチン類似体であり、各類似体には少なくとも1つのビルディング単位を組み入れ、該ビルディング単位には、アミド、チオエーテル、チオエステルもしくはジスルフィドを含む架橋基に結合したペプチド主鎖の1つの窒素原子が含まれるが、少なくとも1つのビルディング単位は該架橋基を介して結合し、第2ビルディング単位、該ペプチド配列のアミノ酸残基側鎖またはN末端アミノ酸残基からなる群より選択される部分を有する環状構造を形成する。好ましくは、該ペプチド配列には4~14残基、より好ましくは4~12アミノ酸s、最も好ましくは5~9アミノ酸が組み入れられる。

#### 【 0 0 2 4 】

従来は、コンホメーションが拘束された主鎖環化ソマトスタチン類似体は、主

に受容体サブタイプ5に対する選択性を有していた。これらの類似体の治療上または診断上の利用は制限されていた。

#### 【 0 0 2 5 】

本発明に従って、好ましい類似体が、SSTサブタイプ5よりもサブタイプ3に対して改善された選択性を有するヘキサペプチド類似体であることをこれより開示する。最も好ましい類似体には、ソマトスタチンの新規なオクタペプチド類似体であり、SSTサブタイプ2および5に対して受容体選択性を示すものが含まれる。さらにより好ましいソマトスタチン類似体は、2つのビルディング単位および第2環状構造（側鎖－側鎖、主鎖－主鎖、および主鎖－末端からなる群より選択される）に連結した少なくとも1つの環状構造を含む二環式構造を有利に含む。これらのいくつかの二環式類似体は、SSTサブタイプ2に対する受容体選択性を示す。

#### 【 0 0 2 6 】

本発明の特定のヘキサペプチドの好ましい類似体（本明細書でPTR No. 3123、3113および3171として示す）のために、アミノ酸Asnを位置5にて主鎖Pheビルディング単位で置換した。位置8における天然L-TrpのD-Trpへの構造異性体置換を行って、該類似体の安定性を改善した。位置10のThr残基をその対応する主鎖Pheビルディング単位で置換した。PTR 3113と比較してPTR 3123および3171に示されるような、位置9におけるL-LysからD-Lysへの独特な立体配置置換により、SST受容体サブタイプSST-R5よりむしろSST-R3への結合の改良された選択性が与えられる。

#### 【 0 0 2 7 】

本発明の現在最も好ましい類似体は、SST受容体サブタイプSST-R2およびSST-R5への結合の改良された選択性を有するPTR 3173である。さらに開示した最も好ましい類似体については、アミノ酸のN<sup>α</sup>－ω－官能化誘導体と、前記ペプチド配列のN末端との間に架橋を連結する。本発明の他の好ましい類似体については、末端チオ基を有するN<sup>α</sup>－ω－官能化誘導体を含むビルディング単位と、そのような他のアミノ酸誘導体との間に架橋を連結するか、あるいはCys残基の側鎖に、メルカプト含有酸に、または他の任意のSH含有部分に架橋を連結してジスル

フィド架橋を形成させる。

【 0 0 2 8 】

特定の好ましい類似体については、さらにアミノ酸の置換を開示する。例えば、前記化合物の生物学的利用能を上昇させるため、および経口の生物学的利用能を上昇させるために、またアミノ末端に単糖類および二糖類部分を結合させるために、N-メチル-Phe残基によってPhe残基を置換する。

【 0 0 2 9 】

本発明の最も好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体を表1に記載する。

【 0 0 3 0 】

【 表 1 】

本発明の最も好ましい類似体

PTR	配列	SST-R
3171	Phe*-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(C2)-X	
3113	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-Lys-Phe(N2)-X	3
3123	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(N2)-X	3
3209	Phe(N2)-Tyr-(D)2Nal-Lys-Val-Gly(C2)-Thr-X	1
3183	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Gly(C2)-2Nal-X	5
3185	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Val-Gly(C2)-X	5
3201	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Ser-2Nal-Gly(C2)-X	5
3203	Phe(N2)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-2Nal-Gly(C2)-X	3,5
3173	GABA*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X	2,5
3197	Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X	3
3205	Phe(C3)-Cys*-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys*-Phe-Phe(N3)-X	2
3207	(D)Phe-Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X	2,3
3229	グルタミン-Dab*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X	

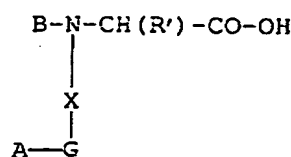
ここで、Xは-NH<sub>2</sub>または-OHであり、架橋基は2つのビルディング単位の上に、または以下に示すように延びている：

PTR 3171およびPTR 3173については、星印は、架橋基がN<sup>ω</sup>-官能化アミノ酸誘導体と、該ペプチドのN末端との間に結合することを示す。PTR 3197およびPTR 3207については、星印は、架橋基がN<sup>ω</sup>-官能化アミノ酸誘導体と、Cys残基の側鎖との間に結合していることを示す。PTR 3205は、2つのビルディング単位（Phe-C3およびPhe-N3）を1つの架橋が連結し、2つ目の架橋が2つのCys残

基間に形成されるジスルフィド架橋である、二環式化合物である。SST-Rは、各類似体が選択性を有するソマトスタチン受容体サブタイプを示す

これらの主鎖環化ソマトスタチンペプチド類似体は、少なくとも1つの $N^{\omega}$ - $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体をペプチド配列中に組み込み、次いで、ペプチド配列中の1つのアミノ酸側鎖を有するか、または他の $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体を有する官能基を選択的に環化することにより調製する。該 $N^{\omega}$ - $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体は、好ましくは以下の式1を有する。

【 0 0 3 1 】



式1

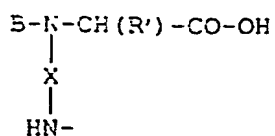
〔式中、Xはアルキレン、置換アルキレン、アリーレン、シクロアルキレンおよび置換シクロアルキレンよりなる群から選ばれるスペーサー基であり；R'は特定の保護基と任意に結合していてもよいアミノ酸側鎖であり；Bはアルキルオキシ、置換アルキルオキシ、またはアリールカルボニルよりなる群から選ばれる保護基であり；Gはアミン、チオール、アルコール、カルボン酸、カルボン酸エステル、アルデヒド、アルコールおよびアルキルハライドよりなる群から選ばれる官能基であり；AはGの特定の保護基である〕。

【 0 0 3 2 】

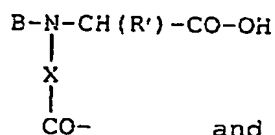
好ましいビルディング単位は、Xがアルキレンであり、Gがチオール基、アミノ基またはカルボキシル基であり、R'がアミノ酸の側鎖である $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体である。さらに好ましいものはR'が特定の保護基で保護されている $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体である。

【 0 0 3 3 】

より好ましいものは下記式を有する $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体である〔式中Gはアミノ基、カルボキシル基、またはチオール基である〕：

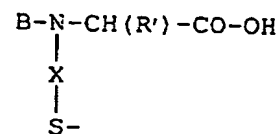


式2



式3

and



式4

〔各式中、X、R'およびBは先に定義したとおりである〕。

## 【 0 0 3 4 】

これらの方法の最も顕著な利点は：

- 1) ペプチドのいずれの側鎖も妥協する(compromising)ことなくペプチド配列の環化が達成され、その結果、生物学的認知および機能に必須の官能基を犠牲にする機会が低くなる。

## 【 0 0 3 5 】

- 2) 環において、架橋の長さ、方向、および結合の型(例えば、アミド、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル等)ならびに結合の位置の置換が達成され、ペプチドコンフォメーションの最適化が可能になる。

## 【 0 0 3 6 】

- 3) 公知の活性を有する直鎖ペプチドの環化に適用された場合、ペプチドの活性領域およびそのコグネイト受容体との相互作用が最小限となるように架橋を設計することができる。これにより、環化アームが認知および機能を妨害する機会が減り、また、放射性トレーサー、細胞障害性薬剤、光捕捉物質(light capturing substances)、または他の所望の標識等のタグの付着に適した部位をつくる。

## 【 0 0 3 7 】

本発明の主鎖環化類似体を、医薬組成物として、ならびに癌(カルチノイド症候群など)、内分泌障害(先端肥大症およびNIDDMなど)、糖尿病関連合併症(糖尿病性腎障害、糖尿病性血管障害および糖尿病性網膜症など)、胃腸疾患、膵炎、自己免疫性疾患(慢性関節リウマチおよび乾癬など)、アテローム硬化症、再狭窄、術後疼痛、ならびに炎症性疾患を含む疾患の治療法に、使用することができる。さらに、本発明のソマトスタチン類似体は、アテローム硬化症および再狭窄に関与する増殖因子の阻害によって、これら疾患を予防するのに有用だろう



## 【 0 0 3 8 】

本発明で開示される好ましい類似体は、代謝安定性、in-vivo活性の選択性および安全性の独特な特徴を有する。開示される最も好ましい類似体（PTR 3173）は、カルチノイド腫瘍、先端肥大症および糖尿病関連合併症の治療のための、明らかな治療上の可能性を有する薬物候補を提供する。この最も好ましい類似体は、インシュリンまたはグルカゴンに対してかなり作用することなく成長ホルモン阻害における入手可能なソマトスタチン類似体と効力が等しいという点で、現在入手可能な他のいかなるソマトスタチン類似体をもしのぐ有意な利点を有する。

## 【 0 0 3 9 】

上記医薬組成物は、薬学的に活性な主鎖環化ソマトスタチンアゴニストもしくはアンタゴニスト、および本発明の他の実施形態に示す薬学的に許容される担体または希釈剤を含み、かかる組成物を使用した癌、内分泌障害、胃腸疾患、糖尿病関連合併症、膵炎、自己免疫性疾患、ならびに炎症性疾患、アテローム硬化症および再狭窄の治療法に関する。本発明の医薬組成物は、1または2つのソマトスタチン受容体サブタイプに対し選択性を有する少なくとも1つの主鎖環化ペプチド類似体を有利に含む。これらの医薬組成物は、局所投与もしくは全身性投与で、経口を含む任意の適切な投与経路で投与しうる。好ましい投与方法には、限定するものではないが、静脈内および筋肉内注射などの非経口経路、ならびに経鼻もしくは経口摂取が含まれる。

## 【 0 0 4 0 】

本発明の主鎖環化類似体はまた、癌の診断法および腫瘍またはそれらの転移の存在を画像化する方法において医薬組成物として使用してもよい。癌を診断する方法には、ヒト患者を含む哺乳動物に、主鎖環化類似体または放射性同位体および非放射性トレーサーからなる群より選択される検出可能なプローブで標識した類似体を投与することが含まれる。かかる組成物を使用した癌の診断法または画像化法は、本発明の他の実施形態を示す。

## 【 0 0 4 1 】

発明の詳細な説明

本明細書中に記載した化合物は不斉中心を持ちうる。すべてのキラル形、ジアステレオマー形、およびラセミ形は本発明に含まれる。本明細書中に記載した化合物には、二重結合等の多数の幾何学的異性体も存在しうる。そして、このような安定な異性体の全ては本発明に包含される。

【 0 0 4 2 】

「安定な化合物」または「安定な構造」という表現により、本明細書では、反応混合物から有用な程度の純度にまで単離するのに耐え、そして有効な治療剤に製剤化するのに耐える、十分に丈夫な(robust)化合物が意味される。

【 0 0 4 3 】

本明細書および請求の範囲で使用される「アルキル」または「アルキレニル」という用語は、1～10個の炭素原子を有する分枝および直鎖の飽和脂肪族炭化水素基を含むものとする；「アルケニル」という語は、2～10個の炭素原子を有する直線または分枝配置の炭化水素鎖、および鎖にそった任意の安定した点に存在しうる1つまたはそれ以上の不飽和炭素-炭素結合を含むものとする（例えば、エテニル、プロペニル、等）；そして、「アルキニル」という用語は、2～10個の炭素原子を有する直線または分枝配置の炭化水素鎖、および鎖にそった任意の安定した点に存在しうる1つまたはそれ以上の三重炭素-炭素結合を含むものとする（例えば、エチニル、プロビニル、等）。

【 0 0 4 4 】

本明細書および請求の範囲で使用される「アリール」という用語は、任意の安定な5員から7員の単環または二環の、または7員から14員の二環または三環の炭素環を含むものとし、そのうち任意のものが飽和、部分的に不飽和、または芳香族の環でありうる。例えば、フェニル、ナフチル、インダニル、またはテトラヒドロナフチル、等である。

【 0 0 4 5 】

本明細書および請求の範囲で使用される「アルキルハライド」という用語は、1～10個の炭素原子を有する分枝および直鎖の飽和脂肪族炭化水素であって、1～3個の水素原子がCl、F、BrおよびI等のハロゲン原子によって置換されているものを含むものとする。

## 【 0 0 4 6 】

本明細書および請求の範囲で使用される「治療上有効な量」という表現は、本明細書に記載の症候（例えば、炎症性疾患、癌、内分泌障害および胃腸障害を含むが、それらだけに限定されない）に関し所望の結果を達成するために宿主に投与すべき、新規な主鎖環化ペプチド類似体またはそれを含む組成物の量を意味する。

## 【 0 0 4 7 】

本明細書および請求の範囲で使用される「置換（された）」という用語は、特定の原子上の任意の1つまたはそれ以上の水素原子が、特定の群から選ばれたものによって置換されることを意味する。ただし、上記特定の原子の標準原子価は超過されず、またこの置換は安定な化合物をもたらすものとする。

## 【 0 0 4 8 】

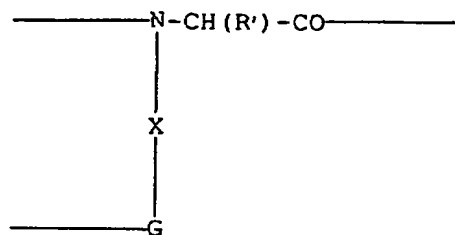
任意の可変記号（例えば、R、X、Z、等）が任意の構成または本明細書に記載の任意の式に2回以上使用されている場合は、各場合におけるその定義は他の場合における定義から独立している。また、置換基および／または可変記号の組合せは、その組合せが安定な化合物をもたらす場合のみ許容される。

## 【 0 0 4 9 】

本明細書中に使用される「ペプチド」とは、ペプチド結合により結合されたアミノ酸の配列を指す。本発明のソマトスタチンペプチド類似体は、4～24個のアミノ酸残基、好ましくは4～14個のアミノ酸、より好ましくは4～12個のアミノ酸、最も好ましくは5～9個のアミノ酸からなる配列を含み、各残基はアミノ末端及びカルボキシ末端を有することを特徴とする。

## 【 0 0 5 0 】

「ビルディング単位」とは、以下の一般式5：



式5

〔式中、Xはアルキレン、置換アルキレン、アリーレン、シクロアルキレンおよび置換シクロアルキレンよりなる群から選ばれるスペーサー基であり；R'は特定の保護基と任意に結合していてもよいアミノ酸側鎖であり；及びGはアミン、チオール、アルコール、カルボン酸、カルボン酸エステル、およびアルキルハライドよりなる群から選ばれる官能基である。〕

を有し、ペプチド配列中に組み入れられ、続いて、官能基Gを介して前記ペプチド配列中のアミノ酸の側鎖の1つとともに、または他の $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体とともに選択的に環化される、N<sup>\*</sup>誘導体化 $\alpha$ アミノ酸を指す。

## 【0051】

ビルディング単位を生成する方法は、W095/33765およびW098/04583、ならびに米国特許第5,770,687号および第5,883,293号（全てその全文を本明細書に記載されるように本明細書中に参考として組み込まれる）に記載されている。ビルディング単位は、対応する修飾されたアミノ酸の3文字コードの後に反応基のタイプ（アミンの場合はN、カルボキシルの場合はC）及びスペーサーメチレン基の数の表示を添えて略記される。例えばGly-C2は、1個のカルボキシル反応基及び2個の炭素メチレンスペーサーで修飾されたGly残基を表し、Phe-N3は、1個のアミノ反応基と3個の炭素メチレンスペーサーで修飾されたフェニルアラニン基を示す。

## 【0052】

一般式において、上記ビルディング単位は、ある位置における主鎖窒素原子が上記の式に記載される架橋基の結合点であることを示す、文字Nの後ろにある配列中のその位置に対応する上付き文字を有するRと略する。

## 【0053】

本明細書中で使用される「主鎖環化ペプチド」とは、ペプチド主鎖の $\alpha$ 窒素を介して他のビルディング単位又はその配列の中の他のアミノ酸に結合して架橋を形成した、少なくとも1つのビルディング単位を含む直鎖状ペプチドの類似体を指す。

#### 【 0 0 5 4 】

この発明並びにその製造及び使用方法を説明するために、本明細書中に一定の略語を使用する。例えば、AcOHは酢酸を、Allocはアリルオキシカルボニルを、Bocはt-ブチルオキシカルボニル基を、BOPはベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス-(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェートを、DCCはジシクロヘキシルカルボジイミドを、DCMはジクロロメタンを、DIEAはジイソプロピル-エチルアミンを、DMFはジメチルホルムアミドを、EDTはエタンジチオールを、Fmocはフルオレニルメトキシカルボニル基を、GHは成長ホルモンを、HBTUは1-ヒドロキシベンゾトリアゾリルテトラメチル-ウロニウムヘキサフルオロホスフェートを、HFは弗化水素酸を、HOBTは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを、HPLCは高速液体クロマトグラフィーを、IGFはインスリン増殖因子を、MSは質量分光測定法を、NIDDMはインスリン非依存性糖尿病を、NMMはN-メチルモルホリンを、NMPは1-メチル-2-ピロリドノン (pyrrolidone) を、PyBOPはベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェートを、PyBrOPはブromo-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェートを、rtは室温を、SRIFはソマトスタチン放出阻害因子を、TBTUは2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム四フッ化ホウ酸塩を、t-Buは第三ブチル基を、TFAはトリフルオロ酢酸を、VIPは血管作動性ペプチドを指す。

#### 【 0 0 5 5 】

本発明に使用されるアミノ酸は、市販されているもの又は通常の合成方法により得られるものである。幾つかの残基はペプチドに組み込むために特別な方法を要する。またペプチド配列に導くための連続式、分岐式、及び収束式合成方法が、本発明において有用である。天然のコードされたアミノ酸及びその誘導体は、IUPAC協定に従って3文字コードで表される。指示が無い場合は、L異性体を使用

した。D異性体は、残基の略語の前に“D”で示される。コードされていないアミノ酸のリストは以下の通りである：Abuは2-アミノ酪酸を、Aibは2-アミノイソ酪酸を、 $\beta$ -Alaは $\beta$ アラニンを、ChyGlyはシクロヘキシルグリシンを、Dabはジアミノ酪酸を、GABAは $\gamma$ アミノ酪酸を、Hcysはホモシステインを、(p-Cl)Pheはp-クロロ-フェニルアラニンを、(p-NH<sub>2</sub>)Pheはp-アミノフェニルアラニンを、(p-F)Pheはp-フルオロフェニルアラニンを、(p-NO<sub>2</sub>)Pheはp-ニトロフェニルアラニンを、1Nalは1-ナフチルアラニンを、2Nalは2-ナフチルアラニンを、Nvaはノルバリンを、Thiはチエニルアラニンを指す。

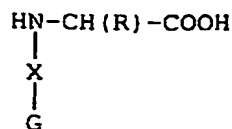
#### 【 0 0 5 6 】

当業者に公知の保存的アミノ酸置換は本発明の範囲内である。保存的アミノ酸置換には、1つのアミノ酸の、同じ種類の官能基または側鎖（例えば、脂肪族、芳香族、陽性に荷電、陰性に荷電）を有する他のアミノ酸による置換が含まれる。またこれらの置換には、前記化合物の生物学的利用能を増大させるため、および経口の生物学的利用能を増大させるためのアミノ末端における単糖類と二糖類部分の結合のための、N-メチル-Phe残基によるPhe残基の置換（Nelson-Piercyら、J. Clin. Endocrinol. And Metab. 78:329, 1994）、あるいは経口の生物学的利用能、中枢神経系への侵入、特異的細胞集団への標的指向などを増大させるような他の置換が含まれる。

#### 【 0 0 5 7 】

##### 合成方法

本発明によれば、ペプチド類似体は新規な非ペプチド結合を生じるアミノ酸の $\alpha$ 窒素に結合された架橋基によって環化される。一般に、このようなペプチド類似体をビルディング単位から構築するために用いられる手順は、公知のペプチド合成の原則に依存する。最も有利には、この手順は固相ペプチド合成の公知原理に従って行うことができる。本発明の工夫は、ペプチド配列中の1個以上のアミノ酸を下記の一般式で表される新規なビルディング単位で置換することを要する：



式6

式中、Rはアミノ酸の側鎖、Xはスペーサー基、およびGはこれによって環化が行なわれる末端官能基である。側鎖Rは、選択したペプチド配列中に組み込むべく選択された任意の天然または合成アミノ酸の側鎖である。Xは、ペプチド類似体の適切なコンフォメーションの拘束(conformational constraints)を達成するために、より大きいまたは小さい程度のフレキシビリティをもたらしために選択されるスペーサー基である。このようなスペーサー基は、アルキレン鎖、置換、分枝または不飽和アルキレン、アリーレン、シクロアルキレン、並びに不飽和および置換シクロアルキレンを含む。さらに、XおよびRを組み合わせて複素環構造を形成することができる。

## 【 0 0 5 8 】

ペプチド類似体の環化に用いるべき末端(ω)官能基は以下のものを含むがそれらだけに限定されない。すなわち：

a. 活性化カルボキシル基、アルデヒドおよびケトン（引き続く還元を伴う、または伴わない）、およびアルキルまたは置換アルキルハライド等の求電子剤と反応させるためのアミン類。

## 【 0 0 5 9 】

b. 活性化カルボキシル基等の求電子剤と反応させるためのアルコール類。

## 【 0 0 6 0 】

c. ジスルフィド結合を形成させ、また活性化カルボキシル基、およびアルキルまたは置換ハロゲン化アルキル等の求電子剤と反応させるためのチオール類。

## 【 0 0 6 1 】

d. アセタールおよびケタールを形成させるための1,2および1,3ジオール類。

## 【 0 0 6 2 】

e. アミン、チオールまたはカルバニオン等の求核剤；遊離基；アルデヒドおよびケトン等の求電子剤及びアルキルハライド又は置換アルキルハライド；または

有機金属錯体、と反応させるためのアルキン類または置換アルキン類。

【 0 0 6 3 】

f. アミン、アルコール、およびチオール等の求核剤（まえもって活性化して、または活性化せずに）と反応させるためのカルボン酸およびそのエステル。

【 0 0 6 4 】

g. アミン、アルコール、チオールおよびカルバニオン（アセト酢酸またはマロン酸等の活性メチレン基に由来する）等の求核剤と反応させるため；およびアルケンまたは置換アルケン、およびアルキンまたは置換アルキンとの次なる反応のために遊離基を形成するための、アルキルまたは置換アルキルハライドまたはそのエステル類。

【 0 0 6 5 】

h. アミン（引き続く還元を伴う、または伴わない）、カルバニオン（アセト酢酸またはマロン酸等の活性メチレン基に由来する）、ジオール（アセタールおよびケタールの形成のため）等の求核剤と反応させるためのアルキルまたはアリールアルデヒド類およびケトン類。

【 0 0 6 6 】

i. アミン、チオール、カルバニオン、遊離基または有機金属錯体と反応させるためのアルケン類または置換アルケン類。

【 0 0 6 7 】

j. アルデヒドおよびケトン、およびアルキルまたは置換アルキルハライド等の求電子剤と反応させるための、マロン酸エステル、アセト酢酸エステル、等の活性メチレン基。

【 0 0 6 8 】

ペプチド合成の間、これらの反応性末端基および任意の反応性側鎖が適切な保護基によって保護されなければならないことが理解されるであろう。

【 0 0 6 9 】

アミンの適切な保護基は、アルキルオキシ、置換アルキルオキシ、およびアリールオキシカルボニル、例えば第三級ブチルオキシカルボニル (Boc)、フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc)、アリルオキシカルボニル (Alloc) およびベ



ンジルオキシカルボニル(2)を含むがそれらだけに限定されない。

【 0 0 7 0 】

環化のためのカルボン酸末端基は、それらのアルキルまたは置換アルキルエステルまたはチオエステルまたはアリールまたは置換アリールエステルまたはチオエステルとして保護することができる。このような基の例は、第三級ブチルエステル、アリルエステル、ベンジルエステル、2-(トリメチルシリル)エチルエステルおよび9-メチルフloreニルを含むが、それらだけに限定されない。

【 0 0 7 1 】

環化のためのチオール基は、それらのアルキルまたは置換アルキルチオエーテルまたはジスルフィドまたはアリールまたは置換アリールチオエーテルまたはジスルフィドとして保護することができる。このような基の例は、第三級ブチル、トリチル(トリフェニルメチル)、ベンジル、2-(トリメチルシリル)エチル、ピクシル(9-フェニルキサントフェン-9-イル)、アセトアミドメチル、カルボキシ-メチル、2-チオ-4-ニトロピリジルを含むが、それらだけに限定されない。

【 0 0 7 2 】

当業者には、種々の反応性部分がそれらの選択的除去を可能とする異なる保護基によって保護されることが、さらに理解されるであろう。したがって、N<sup>\*</sup>が例えば保護基Aによって保護される場合、特定のアミノ酸がペプチド配列中の隣接アミノ酸に結合されるであろう。反応スキームにおいて環化のための末端基としてアミンが用いられる場合は、N<sup>\*</sup>は保護基Bによって保護されるか、または配列中の任意のリシンのεアミノ基は保護基Cによって保護されるであろう、等である。

【 0 0 7 3 】

アミノ酸を相互に結合させることは、ペプチド合成技術で公知の一連の反応として実施される。本発明の新規なビルディング単位、すなわちN<sup>\*</sup>-ω官能化アミノ酸誘導体はペプチド配列に組み込まれて、アミノ酸の1個以上と置き替わる。このようなN<sup>\*</sup>-ω官能化アミノ酸誘導体が1つだけ選択される場合は、配列中の別なアミノ酸の側鎖と、またはペプチド配列の2つの末端アミノ酸のいずれかと環化されるであろう。例えば、(a) N<sup>\*</sup>-(ω-アミノアルキレン)アミノ酸

をアスパラギン酸またはグルタミン酸残基のカルボキシル基に結合させることができる；(b)  $N^{\omega}$ -( $\omega$ -カルボン酸アルキレン) アミノ酸をリシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基に結合させることができる；(c)  $N^{\omega}$ -( $\omega$ -チオアルキレン) アミノ酸をシステイン残基のチオール基に結合させることができる；等である。本発明のより好ましい実施態様は、相互に結合されてN-主鎖-N-主鎖環化ペプチド類似体を形成することができる2個のこのような  $N^{\omega}$ - $\omega$ 官能化アミノ酸誘導体を組み込む。3個以上のこのようなビルディング単位をペプチド配列に組み込んで、以下に詳述する二環式ペプチド類似体を創出することができる。

#### 【 0 0 7 4 】

このように、ペプチド類似体はN-主鎖-N-主鎖環化、主鎖-側鎖環化または他の任意のペプチド環化を含む2つ以上の環化によって構築することができる。上記のように、新規のビルディング単位から本発明のソマトスタチン類似体を構築するために用いる手順は、公知のペプチド合成の原則に依存している。しかし、本発明のより嵩の大きいビルディング単位に合わせて手順を適合させる必要があることが理解されるであろう。固相ペプチド化学におけるアミノ酸の結合は、以下のものを含むがそれらだけに限定されない結合剤を手段として達成することができる。すなわち、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ビス(2-オキソ-3-オキサゾリジニル)ホスフィン酸塩化物(BOP-Cl)、ベンゾトリアゾリル-N-オキシトリスジメチル-アミノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、1-オキソ-1-クロロホスホラン(Cpt-Cl)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、またはこれらの混合物である。

#### 【 0 0 7 5 】

本発明の嵩の大きいビルディング単位への次のアミノ酸の結合には、以下のものを含むがそれらだけに限定されない付加的結合剤の使用を要する場合があることが判明した。すなわち、PyBOP(ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリスピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、PyBrOP(プロモトリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)、HBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート)、TBTU(2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロ

【 0 0 7 6 】

【 0 0 7 7 】

【 0 0 7 8 】

【 0 0 7 9 】

【 0 0 8 0 】

[illegible]

式7

R<sup>6</sup> は、(D) - もしくは (L) - Phe または Tyr であり、

R<sup>7</sup>は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、またはTyrであり、  
R<sup>8</sup>は、(D)-もしくは(L)-Trpであり、  
R<sup>9</sup>は、(D)-もしくは(L)-Lysであり、  
R<sup>10</sup>は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、  
R<sup>11</sup>は、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-Ala、Nle、またはCysであり、  
R<sup>12</sup>は、Gly、Val、Leu、(D)-もしくは(L)-Pheまたは1Nalもしくは2Nalである]  
を有する。

## 【 0 0 8 1 】

この実施形態による最も好ましい化合物をPTR 3173と呼び、式中の残基は、  
Qが水素であり、  
R<sup>5</sup>がGABAであり、  
R<sup>6</sup>がPheであり、  
R<sup>7</sup>がTrpであり、  
R<sup>8</sup>が(D)Trpであり、  
R<sup>9</sup>がLysであり、  
R<sup>10</sup>がThrであり、  
R<sup>11</sup>がPheであり、  
R<sup>12</sup>がGlyであり、  
nが3であり、そして  
Xがアミドである。

## 【 0 0 8 2 】

この実施形態による別の好ましい化合物をPTR 3229と呼び、式中の残基は、  
Qがガラクトースであり、  
R<sup>5</sup>がDabであり、  
R<sup>6</sup>がPheであり、  
R<sup>7</sup>が(L)-Trpであり、

$R^6$  が (D)-Trp であり、

$R^9$  が Lys であり、

$R^{10}$  が Thr であり、

$R^{11}$  が Phe であり、

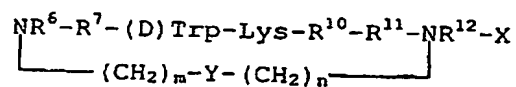
$R^{12}$  が Gly であり、

$n$  が 3 であり、そして

$X$  が アミド である。

【 0 0 8 3 】

別の実施形態は、下記の一般式：



式8

[式中、 $m$ および $n$ は、1～5であり、

$X$ は、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^6$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、Tyr、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{10}$ は、Thr、Val、Ser、またはCysであり、

$R^{11}$ は、Val、(D)-もしくは(L)-1NaI、(D)-もしくは(L)-2NaI、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、Gly、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、そして

$Y$ は、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する。

【 0 0 8 4 】

好ましくは、

$R^6$ は(D)-もしくは(L)-Pheであり、

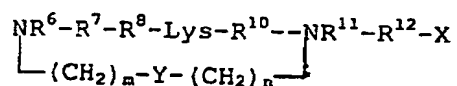
$R^7$ はTyrまたはPheであり、

$R^{10}$ はThr、ValまたはSerであり、

Yはアミドである。

【 0 0 8 5 】

さらに別の実施形態は、下記の一般式：



式9

を有する。

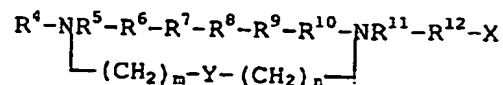
【 0 0 8 6 】

$R^{1,2}$  は Thr、1NaI または 2NaI であり、そして

Yはアミドである。

【 0 0 8 7 】

1つのより好ましい実施形態は、下記式：



式10

[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基、またはアルコール基を表し、

R<sup>4</sup>は、存在しないか、または1～4アミノ酸の末端基であり、

R<sup>5</sup>は、1Nal、2Nal、β-Asp(Ind)、Gly、Tyr、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

R<sup>6</sup>およびR<sup>7</sup>は、存在しないか、あるいは独立してGly、Tyr、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

R<sup>8</sup>は、(D)-もしくは(L)-Trpであり、

R<sup>9</sup>は、(D)-もしくは(L)-Lysであり、

R<sup>10</sup>は、存在しないか、あるいはGly、Abu、Cys、Thr、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

R<sup>11</sup>は、Cys、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

R<sup>12</sup>は、存在しないか、あるいはVal、Thr、1Nalまたは2Nalであり、そして

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する。

【 0 0 8 8 】

好ましくは、

R<sup>4</sup>は存在せず、

R<sup>5</sup>は(D)-もしくは(L)-Phe、または(D)-もしくは(L)-Alaであり、

R<sup>6</sup>は存在しないか、あるいは(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであることができる、

R<sup>7</sup>は(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであり、

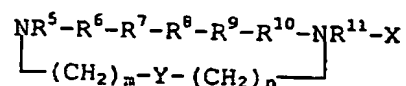
$R^{10}$ は存在しないか、あるいはThr、Valまたは(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{11}$ は(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、そして

$R^{12}$ は存在しない。

【 0 0 8 9 】

別の実施形態は、下記の一般式：



式11

[式中、 $m$ および $n$ は、1～5であり、

$R^5$ は、(L)-もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^6$ は、(L)-もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、存在しないか、あるいは(L)もしくは(D)-Phe、Tyrまたは(D)もしくは(L)-Alaであり、

$R^8$ は、(D)-もしくは(L)-Trpであり、

$R^9$ は、(D)-もしくは(L)-Lysであり、

$R^{10}$ は、存在しないか、あるいはThr、Val、Cysまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^{11}$ は、(L)もしくは(D)-Phe、Cys、または(D)-もしくは(L)-Alaであり、

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する。

【 0 0 9 0 】

好ましくは、

$R^6$ は(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は存在しないか、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{10}$ はThrであり、

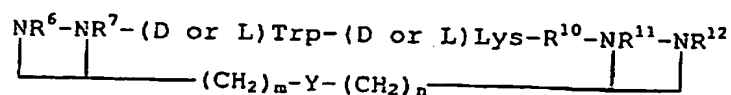
$R^{11}$ はCysであり、そして

Xはアルコール基である。

【 0 0 9 1 】



さらに別の実施形態は、下記の一般式：



式12

[式中、線は、架橋が一端でNR<sup>6</sup>またはNR<sup>7</sup>に結合し、かつもう一方の端でNR<sup>11</sup>またはNR<sup>12</sup>に結合していることを示し、

R<sup>6</sup>は、存在しないか、あるいは(D)-もしくは(L)-PheまたはAlaであり、

R<sup>7</sup>は、(D)-もしくは(L)-Phe、AlaまたはTyrであり、

R<sup>8</sup>は、Thr、Ala、ValまたはCysであり、

R<sup>11</sup>は、存在しないか、あるいは(D)-もしくは(L)-Phe、Ala、またはCysであり、

R<sup>12</sup>は、存在しないか、またはThrもしくはアルコールに還元されたThrであり、  
、そして

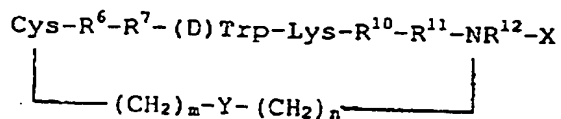
Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する。

【 0 0 9 2 】

好ましくは、前記架橋はNR<sup>6</sup>およびNR<sup>11</sup>に結合しているか、またはNR<sup>6</sup>およびNR<sup>12</sup> (ここでR<sup>12</sup>はアルコールに還元されているThrである) に結合している。

【 0 0 9 3 】

別の好ましい実施形態は、下記の一般式：



式13

[式中、mおよびnは1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

R<sup>6</sup>は、(D)-もしくは(L)-PheまたはTyrであり、

$R^7$  は、(D) - もしくは (L) - Trp、(D) - もしくは (L) - Phe、(D) - もしくは (L) - 1Nal、(D) - もしくは (L) - 2Nal、または Tyr であり、  
 $R^{10}$  は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D) - もしくは (L) - Ala、または (D) - もしくは (L) - Phe であり、  
 $R^{11}$  は、(D) - もしくは (L) - Phe または (D) - もしくは (L) - Ala であり、  
 $R^{12}$  は、Gly、Val、または (D) - もしくは (L) - Phe であり、そして  
Y は、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する。

## 【 0 0 9 4 】

好ましくは、

$R^9$  は Phe であり、

$R^7$  は Trp であり、

$R^{10}$  は Thr であり、

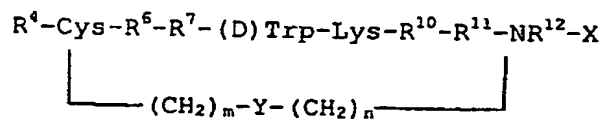
$R^{11}$  は Phe であり、

$R^{12}$  は Gly であり、そして

Y はジスルフィドである。

## 【 0 0 9 5 】

別の好ましい実施形態は、下記の一般式：



式14

[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^4$  は、(D) - もしくは (L) - Phe または Tyr であり、

$R^6$  は、(D) - もしくは (L) - Phe または Tyr であり、

$R^7$  は、(D) - もしくは (L) - Trp、(D) - もしくは (L) - Phe、(D) - もしくは (L) - 1Nal、(D) - もしくは (L) - 2Nal、または Tyr であり、

$R^{10}$ は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{11}$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^{12}$ は、Gly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、そして

Yは、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]  
を有する。

【 0 0 9 6 】

好ましくは、

$R^4$ は(D)Pheであり、

$R^6$ はPheであり、

$R^7$ はTrpであり、

$R^{10}$ はThrであり、

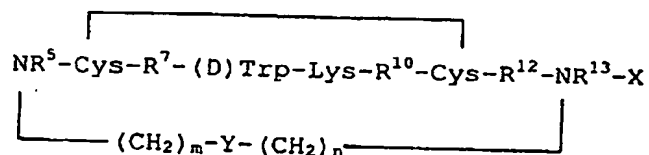
$R^{11}$ はPheであり、

$R^{12}$ はGlyであり、そして

Yはジスルフィドである。

【 0 0 9 7 】

別のより好ましい実施形態は、下記の一般式：



式15

[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^5$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、またはTyrであり、

$R^{10}$ は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、Gly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{13}$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、そして

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する。

【 0 0 9 8 】

好ましくは、

$R^5$ はPheであり、

$R^7$ はPheであり、

$R^{10}$ はThrであり、

$R^{12}$ はGly、Val、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{13}$ はPheであり、そして

Yはアミドである。

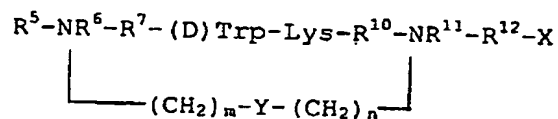
【 0 0 9 9 】

さらに好ましい実施形態では、複数ペプチド並行合成法を用いて合成される。

これらには、下記の4群(A~D)のヘプタペプチドおよびオクタペプチド類似体が含まれる。

【 0 1 0 0 】

A群



式16

[式中、mおよびnは、1~5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^5$ は、存在しないか、または2NaIであり、

$R^6$ は、PheまたはGlyであり、

$R^7$ は、(p-Cl)Phe、(p-NH<sub>2</sub>)Phe、(p-F)Phe、(p-NO<sub>2</sub>)PheまたはChxGlyであり、

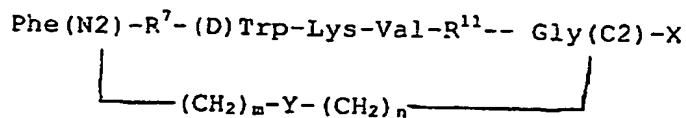
$R^{10}$ は、Val、Gly、または(D)ChxGlyであり、

$R^{11}$  は、TrpまたはGlyであり、

$R^{12}$  は、2NalまたはThrであり、

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

#### B群



式17

[式中、mおよびnは、1～5であり、

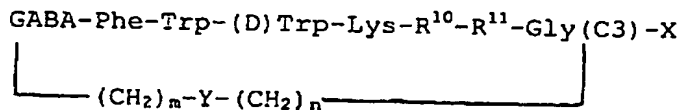
Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^7$  は、(p-Cl)Phe、(p-NH<sub>2</sub>)Phe、(p-NO<sub>2</sub>)PheまたはTyrであり、

$R^{11}$  は、Ile、ValまたはAlaであり、

Yは、アミドである]

#### C群



式18

[式中、mおよびnは、1～5であり、

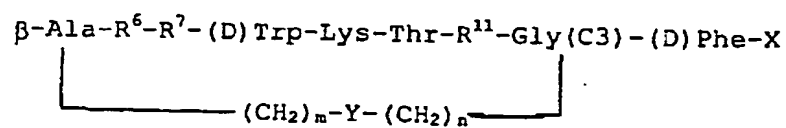
Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^{10}$  は、Ala、Abu、Nle、ValまたはThrであり、

$R^{11}$  は、Phe、Tyr、(p-Cl)Phe、(p-NH<sub>2</sub>)Phe、(p-NO<sub>2</sub>)Pheまたは(p-F)Pheであり

Yは、アミド、チオエーテルまたはチオエステルである]

#### D群



## 式19

[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

R<sup>6</sup>は、Val、Phe、(p-F)Pheまたは(p-Cl)Pheであり、

R<sup>7</sup>は、Trp、Tyr、(p-Cl)Phe、(p-NH<sub>2</sub>)Phe、(p-F)Phe、(p-NO<sub>2</sub>)PheまたはChxGlyであり、

R<sup>11</sup>は、ValまたはChxGlyであり、

Yは、アミドである]

複数並行合成群の好ましい類似体を下記の表2に示す。

【 0 1 0 1 】

【表2】

好ましい複数並行合成配列

Pep No.	SRIF配列中の位置									
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
5		Phe(N2)	(p-NH <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Val	Gly(C2)	2Nal		A
6		Phe(N2)	(p-Cl)Phe	(D)Trp	Lys	Val	Gly(C2)	2Nal		
7		Phe(N2)	(p-F)Phe	(D)Trp	Lys	Val	Gly(C2)	2Nal		
8		Phe(N2)	(p-NO <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Val	Gly(C2)	2Nal		
35		Phe(N2)	(p-Cl)Phe	(D)Trp	Lys	Gly	Trp(C3)	Thr		
72	2Nal	Gly(N3)	ChxGly	(D)Trp	Lys	(D)ChxGly	Gly(C2)	Thr		
22		Phe(N2)	Tyr	(D)Trp	Lys	Val	Ile	Gly(C2)		B
27		Phe(N2)	(p-NH <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Val	Val	Gly(C2)		
28		Phe(N2)	(p-Cl)Phe	(D)Trp	Lys	Val	Ala	Gly(C2)		
30		Phe(N2)	(p-NO <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Val	Val	Gly(C2)		
52	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Ala	Phe	Gly(C3)		C
53	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Abu	Phe	Gly(C3)		
56	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Nle	Phe	Gly(C3)		
58	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Val	Phe	Gly(C3)		
61	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	Phe	Gly(C3)		
62	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	(p-NH <sub>2</sub> )Phe	Gly(C3)		
63	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	(p-Cl)Phe	Gly(C3)		
64	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	(p-F)Phe	Gly(C3)		
65	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	(p-NO <sub>2</sub> )Phe	Gly(C3)		
66	GABA	Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	Tyr	Gly(C3)		
83	$\beta$ -Ala	(p-Cl)Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	ChxGly	GlyC3	(D)Phe	D
84	$\beta$ -Ala	(p-F)Phe	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	ChxGly	GlyC3	(D)Phe	
88	$\beta$ -Ala	Val	Trp	(D)Trp	Lys	Thr	ChxGly	GlyC3	(D)Phe	
89	$\beta$ -Ala	Phe	Tyr	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	
90	$\beta$ -Ala	Phe	(p-NO <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	
91	$\beta$ -Ala	Phe	(p-Cl)Phe	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	
92	$\beta$ -Ala	Phe	(p-F)Phe	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	
93	$\beta$ -Ala	Phe	(p-NH <sub>2</sub> )Phe	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	
94	$\beta$ -Ala	Phe	ChxGly	(D)Trp	Lys	Thr	Val	GlyC3	(D)Phe	

本発明による最も好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体を表3に示す。

【 0 1 0 2 】

【 表 3 】

最も好ましい類似体

PTR	配列
3171	Phe*-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(C2)-X
3113	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-Lys-Phe(N2)-X
3123	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(N2)-X
3209	Phe(N2)-Tyr-(D)2Nal-Lys-Val-Gly(C2)-Thr-X
3183	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Gly(C2)-2Nal-X
3185	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Val-Gly(C2)-X
3201	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Ser-2Nal-Gly(C2)-X
3203	Phe(N2)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-2Nal-Gly(C2)-X
3173	GABA*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X
3197	Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X
3205	Phe(C3)-Cys*-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys*-Phe-Phe(N3)-X
3207	(D)Phe-Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X
3229	ガラクトース-Dab*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X

式中、Xは-NH<sub>2</sub>または-OHであり、2つのビルディング単位、すなわち下記のものの間には架橋基が伸びている。PTR 3171およびPTR 3173については、星印(\*)は、架橋基がアミノ酸のN<sup>\*</sup>-ω-官能化誘導体とペプチドのN末端との間に結合していることを示す。PTR 3197およびPTR 3207については、星印は、架橋基がアミノ酸のN<sup>\*</sup>-ω-官能化誘導体とCys残基の側鎖との間に結合していることを示す。PTR 3205は二環式化合物であり、第1の架橋は2つのビルディング単位(Phe-C3およびPhe-N3)を繋ぎ、第2の架橋は2つのCys残基間で形成されるジスルフィド架橋である。

#### 【 0 1 0 3 】

ソマトスタチンはテトラデカペプチドホルモンであり、その多くの調節機能は5つの受容体ファミリーによって媒介される。その受容体ファミリーの発現は、組織依存的である。ソマトスタチンの受容体特異的類似体は、様々な疾患の治療における有用な治療剤であると考えられる。このような選択性を有する小ペプチド類似体を設計する試みは、ほとんど成功してこなかった。しかし、本発明のコンフォメーション的に拘束された主鎖環化ソマトスタチン類似体は、SST受容体サブタイプに高度に選択的であることが予期せず見出された。

#### 【 0 1 0 4 】



本発明の主鎖環化ペプチドは、新規な選択的類似体であり、好ましくはソマトスタチン受容体ファミリーの1個の受容体に高い親和性で結合する。PTR 3113およびPTR 3123は、3型ソマトスタチン受容体に対して選択的であるが、以前に研究された類似体ではこの受容体サブタイプに対する特異性を達成することができなかった。PTR 3183、3185および3201は、5型ソマトスタチン受容体に対して選択的である。PTR 3209は、1型受容体に対して選択的である。PTR 3203は、受容体3および5に対して選択的であり、PTR 3173は、受容体2および5に対して選択的である。PTR 3205は、二環式類似体であり、2型ソマトスタチン受容体に対して選択的である。

#### 【 0 1 0 5 】

対応する主鎖六環式類似体 (PTR 3113、3123および3171) のアミノ酸配列は、天然のSRIF-14に由来する最も重要なアミノ酸であると考えられるものに基づいている。文献 (Bauerら、Life Sciences, 31:1133, 1982) 中のデータから、天然のSRIF-14のアミノ酸において、少なくとも位置7~10、すなわちPhe<sup>7</sup>、Trp<sup>8</sup>、Lys<sup>9</sup>およびThr<sup>10</sup>と、好ましくは位置6~10、すなわちPhe<sup>6</sup>、Phe<sup>7</sup>、Trp<sup>8</sup>、Lys<sup>9</sup>およびThr<sup>10</sup>が、該ホルモンのファーマコホア (pharmacophore) にとって必須であることが結論付けられた。

#### 【 0 1 0 6 】

本発明の主鎖類似体は、特殊なアミノ酸修飾を有する5~8個のアミノ酸を含有するのが好ましい。特定の好ましい類似体について、アミノ酸Asnを、位置5で主鎖Pheビルディング単位によって置換した。位置8の天然のL-TrpをD-Trpに立体配座置換させたところ、該類似体の安定性が改善した。位置10のThr残基を欠失させて、対応する主鎖Pheビルディング単位によって配列を完成させた。PTR 3123および3171に示したように、位置9においてL-LysからD-Lysに1個だけ立体配座置換すると、PTR 3113と比較してSST受容体サブタイプSST-R5よりもSST-R3に対する結合選択性が改善する。

#### 【 0 1 0 7 】

さらにより好ましい類似体では、アミノ酸のさらなる修飾を行った。例えば、Phe残基をTyrに置換すると、ヨウ素化が容易になる。Phe残基をN-メチル-Phe残

基に置換すると(例えば、PTR 3173のPhe<sup>6</sup>を置換してPTR 3223を得たり、PTR 3173のPhe<sup>6</sup>およびPhe<sup>11</sup>を置換してPTR 3225を得る)、該化合物の生物学的利用能が増加する。特定の化合物のアミノ末端にモノーおよびジ-サッカライドを付加すると、経口の生物学的利用能が増加する(Nelson-Piercyら、前掲)。例えば、ガラクトースをPTR 3173に類似した化合物のN末端に結合させて、  
ガラクトース-Dab-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-NH<sub>2</sub>  
の配列を有する類似体を得た。この類似体を本明細書においてはPTR 3229と呼ぶ。

#### 【 0 1 0 8 】

特定の最も好ましい類似体(例えば、PTR 3171および3173)においては、架橋を、アミノ酸のN<sup>α</sup>-ω-官能化誘導体とペプチド配列のN末端との間に結合させる。本発明の他の好ましい類似体については、架橋を、末端チオ基を有するN<sup>α</sup>-ω-官能化誘導体を含むビルディング単位と、アミノ酸の別のかかる誘導体との間に結合させるか、あるいは、Cys残基の側鎖、メルカプトを含有する酸、または他の任意のSH含有部分に結合させて、ジスルフィド架橋を形成させる。

#### 【 0 1 0 9 】

本発明の新規な類似体は、短くされた主鎖架橋(すなわち、ペプチド結合の側の1~3個のメチレンのみ)の利用において、主鎖環化技術の新規性に対するさらなる次元を提供する。この手法により、極めて高い硬度のペプチドを得ることができ、また、天然のファーマコホアの望ましいコンフォメーションをさらに拘束することができる。

#### 【 0 1 1 0 】

本発明のヘキサペプチド類似体のさらなる利点は、通常はヘプタまたはオクタペプチドである最も一般的なソマトスタチン合成類似体と比較した場合、相対的に低い分子量(その配列はたった6個のアミノ酸からなる)に関係し、その分子量は、最高でもたった1000ダルトンほどである。

#### 【 0 1 1 1 】

本発明の主鎖環化ソマトスタチン類似体(例えば、PTR 3123、3173、3201および3205)は、酵素による分解に対してかなりの代謝的生体安定性を有することが

判明した。この性状は、潜在的に体内における長期間の活性を提供し得る。該主鎖環化類似体の安定性を、種々の酵素混合物(例えば、腎臓のホモジェネート、ラットの肝臓のホモジェネートおよびヒトの血清)による分解に基づく実験的安定性測定を用いて、代謝的に安定な薬剤であるオクトレオチドの安定性と比較した。全ての試験化合物が、天然のホルモンSRIF-14よりも有意に高い生体安定性を示した。対応する非環化ペプチドのいくつかにおいては、インキュベーション後2時間である程度の分解が観察されたが、これは、環化がペプチドの安定性に著しく寄与することを示している。主鎖の環化に用いるNアルキル化アミノ酸の組み込みは、これらのペプチドに代謝的生体安定性をもたらすことが期待された。

#### 【 0 1 1 2 】

本発明の主鎖環化類似体は、*in vitro*において、ヒトソマトスタチン受容体の規定のサブセットに高い親和性で結合する。この受容体選択性は、*in vivo*におけるその生理学的選択性の可能性を示唆するものである。

#### 【 0 1 1 3 】

*in vitro*における受容体結合と一致して、本発明の主鎖環化類似体は、体内の規定の系に選択的に作用するが、天然のホルモンであるソマトスタチンの他の既知の生理活性には作用しない。例えば、PTR 3173は、薬剤オクトレオチドと同様の規模の成長ホルモン-IGF-1軸に対して、延長された期間の作用により有意な阻害を示すが、インスリンの分泌などのオクトレオチドの欠点はない。PTR 3173はまた、グルカゴンの放出に対して、オクトレオチドよりもかなり小さい作用を有する。従って、PTR 3173は、高血糖を引き起こさないという利点を有しており、2型糖尿病(NIDDM)の治療にとって非常に魅力的な化合物となる。

#### 【 0 1 1 4 】

表4にまとめたように、PTR 3173は、薬剤オクトレオチドを超える有意な生理学的選択性を有する。PTR 3173は、成長ホルモンの強力な阻害剤であるが、グルカゴンに対する活性は極めて小さく、インスリンに対してはほとんど有意な作用はない。

#### 【 0 1 1 5 】

#### 【表4】

オクトレオチドと比較したPTR 3173の生理学的選択性

類似体	GH ID50 μg/kg	グルカゴン ID50 μg/kg	インスリン ID50 μg/kg	GH / インスリン	GH グルカゴン
オクトレオチド	0.08	0.65	26	309	8
PTR 3173	0.1	>100	>1000	>10,000	>1,000

PTR 3123は、グルカゴン分泌の放出だけでなく、成長ホルモンまたはインスリンの分泌の放出をも阻害するので、成長ホルモンおよびインスリンの放出に対する有害作用のないグルカゴノーマのための治療剤となる可能性がある。さらに、PTR 3123は、SST-R3のみを発現する悪性腫瘍のための抗癌剤の候補である。天然のホルモンであるSRIFならびにその合成類似体であるオクトレオチドは、成長ホルモン、グルカゴンおよびインスリンを同時に阻害するので、選択性はない。

【 0 1 1 6 】

PTR 3205は、二環式化合物であり、1つの架橋が2つのビルディング単位を繋ぎ、第2の架橋は2個のCys残基間に形成されたジスルフィド架橋である。この類似体は、2型ソマトスタチン受容体に対して選択的であり、従って、他のソマトスタチン受容体の活性に影響を及ぼすことなくこの受容体サブタイプを発現する悪性腫瘍を画像化し、治療するための抗癌剤の候補である。同様に、PTR 3201などの類似体は、5型ソマトスタチン受容体に対して選択的であり、従って、この受容体サブタイプを発現する悪性腫瘍の治療法を画像化するための候補である。

【 0 1 1 7 】

PTR 3173は、クローン化されたヒトSST-R5を発現するCHO細胞の有意な増殖抑制を示す。このことは、SST-R5を発現する腫瘍(例えば、カルチノイド、脳下垂体腫瘍)の治療における潜在的な役割を示唆している。この類似体はまた、ヒトカルチノイド細胞系からのクロモグラニンAの放出を阻害するが、このことは、抗腫瘍作用を示唆している(実施例5)。

【 0 1 1 8 】

動物において評価されたPTR 3173のユニークな薬物速度論的プロフィールは、

in vitroにおいて評価されたその代謝的生体安定性と一致する。この主鎖環化ソマトスタチン類似体は、フリップフロップ (flip flop) (遅延放出運動的) な薬物速度論を示す。皮下投与すると、見かけの循環半減期は、その消失速度からでなく、その吸収速度から得られる。ラットに皮下投与すると、PTR 3173は、約3時間の循環半減期を有する。この活性は、たった40分の循環半減期しか持たない持続作用性薬剤であるオクトレオチドをはるかに超える。PTR 3173対オクトレオチドの主な薬物速度論的パラメータを、表5に要約する。

【 0 1 1 9 】

【表5】

意識のあるウイスターラットにIVおよびSC投与した後の、PTR 3173対オクトレオチドの主な薬物速度論的パラメータ

経路	薬剤	F (%)	Vss (ml/kg)	T <sub>1/2</sub> β (min)	E %	クリアランス (ml/min/kg)
IV	PTR 3173	-	653	31	10.3	13.0
	オクトレオチド*	-	602	49	21.3	17.6
SC	PTR 3173	99.6	-	170	15.9	13.3
	オクトレオチド*	103	-	40	23.0	17.1

\* サンドラスタチン(酢酸オクトレオチド)から、clinical summary. Sandoz Pharmaceutical Corporation, 1992. Overview and

F- 生物学的利用能 , Vs. - 分布容量  
T<sub>1/2</sub>- 循環半減期 , E - 尿中での抽出

主鎖環化ソマトスタチン類似体PTR 3173は、ソマトスタチン受容体に対して選択的であり、いくつかのかかる受容体に対する結合について類似体およびSRIFの双方をスクリーニングすることにより見出されたように、オクトレオチドよりも有意に弱く他のGタンパク質共役型受容体に結合する(実施例6)。この特性は非常に有益である。何故なら、ソマトスタチンでないものの受容体への結合は、体内において有害作用を引き起こす可能性があるからである。

【 0 1 2 0 】

さらに、PTR 3173は、ヒト末梢血リンパ球(PBL)増殖アッセイにおいて、ヒトリンパ球の分裂を促進しないことが判明した。

## 【 0 1 2 1 】

PTR 3113およびPTR 3123は、6 mg/kgの単回用量でラットに静脈内投与した場合には安全であることが判明した。PTR 3173の最初の安全特性について、様々な種で試験した。安全性試験のための欧州薬局方の規定のもとでは、PTR 3173は、開発のこの段階では安全な薬剤候補であると公表された。成長ホルモン放出の抑制に有効な用量の10000倍高い用量で注入した場合、げっ歯類またはイヌにおいて毒性の徴候は認められなかった。

## 【 0 1 2 2 】

主鎖環化ペプチドの合成、精製および特徴付けのための一般的な方法合成：

樹脂： 1 gのRinkアミドまたはTenta-gel樹脂を、0.2～0.7 mmol/gでロードする。

## 【 0 1 2 3 】

Fmoc-脱保護： 10 mLのNMPを用いて2分間、振盪しながら5回洗浄した後、7 mLのNMP中の20%ピペリジンを用いて15分間、2回処理する。

## 【 0 1 2 4 】

カップリング：

1. 通常のカップリング(単純なアミノ酸へのカップリング)：7 mLのNMP中に3当量のアミノ酸、3当量のPyBroPおよび6当量のDIEAを含有する溶液を用いて、0.5～2時間振盪しながら行う。ニンヒドリン試験によってカップリングをモニターし、ニンヒドリン溶液が黄色になるまで繰り返す。

## 【 0 1 2 5 】

2. 10 mLのDMF中に5当量のDICおよび5当量のHOBtを含有する溶液を用いて、HisおよびAsnをカップリングさせる。

## 【 0 1 2 6 】

3. Glyビルディング単位へのカップリング：7 mLのNMP中に3当量のアミノ酸、3当量のPyBroPおよび6当量のDIEAを含有する溶液を用いて、1～4時間、振盪しながら2回行う。

## 【 0 1 2 7 】

4. Glyでないビルディング単位へのカップリング：15 mlのジオキサンまたはTHF中に5当量のアミノ酸、1.5当量のトリフォスゲン、および13当量のコリジンを含有する溶液を用いて、0.5～2時間、50℃にて振盪しながら2回行う。

【 0 1 2 8 】

ビルディング単位のアリルおよびアロック (alloc) 保護基の除去：5%の酢酸および2.5%のNMMを含有する30 mlのDCM中のペプチド当たり1.5当量のPd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>を用いて、1～4時間、振盪しながら行う。

【 0 1 2 9 】

環化： 7 ml のNMP中に3当量のPyBOPおよび6当量のDIEAを含有する溶液を用いて、0.5～2時間、振盪しながら行う。ニンヒドリン試験によって環化をモニターし、必要に応じて繰り返す。

【 0 1 3 0 】

開裂： スカベンジャー (1～15%のH<sub>2</sub>O、1～5%のTISおよび1～5%のEDT)を補足した82～95%のTFAを用いる。

【 0 1 3 1 】

精製：

各主鎖環化ペプチドのための個々の精製法を分析用HPLCで開発して、他の未精製成分から環化ペプチドを最大限単離する。該分析方法は、通常、固定相としてのC-18 Vydacカラム250x4.6mm、および0.1% TFA混合物勾配を含有する水/ACNを用いて行う。

【 0 1 3 2 】

該分析分離法を2' C-18 Vydac調製法に包含させることによって、調製法を設計する。精製プロセスの間、環化ペプチドを含有するピークを、半自動画分回収装置を用いて回収する。回収した画分を純度チェックのために分析用HPLCに注入する。純粋な画分を混ぜ合わせ、凍結乾燥する。

【 0 1 3 3 】

特徴付け：

混ぜ合わせた純粋な凍結乾燥材料を、純度についてはHPLC、MSおよびキャピラリー電気泳動によって、ならびにペプチド含量およびアミノ酸比測定については

アミノ酸分析によって、分析する。

#### 【 0 1 3 4 】

##### ソマトスタチン類似体の一般的なスクリーニング

主鎖環化ソマトスタチン類似体を、*in vitro*において、天然のペプチド(SRIF-14)のGタンパク質共役型受容体への結合の抑制について、それらを試験することによってスクリーニングする(実施例3)。次いで、高い親和性で結合する類似体を、環状アデノシンーリン酸(cAMP)レベルなどの二次メッセンジャー、チロシンホスファターゼ活性、成長ホルモンおよびクロモグラニンAの分泌、ならびに細胞増殖に対するそれらの影響について試験する。

#### 【 0 1 3 5 】

さらに、活性な類似体を、*in vivo*において、ホルモンおよび酵素の分泌の抑制について試験する。SST-R2およびSST-R5がソマトスタチンのいくつかの内分泌作用を媒介することを示す文献データに基づく特定の関連モデル系は、成長ホルモンの放出、ならびにアミラーゼ、胃酸、インスリンおよびグルカゴンの分泌を抑制するが、これは天然のホルモンであるSRIFおよびソマトスタチン類似体であるオクトレオチドの既知の内分泌活性に基づくものである。

#### 【 0 1 3 6 】

最も好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体であるPTR-3201、PTR-3205およびPTR-3173は、それぞれSST-R5、SST-R2およびSST-R2+SST-R5に対する受容体特異性を有する。これらを用いて、内分泌プロフィールにおける各ソマトスタチン受容体の生理学的役割を解明し、さらに、薬剤候補としてのそれらの可能性を見出した。

#### 【 0 1 3 7 】

いくつかの既知の生物学的に活性なペプチドの配列の一部または以前には知られていなかった新規な配列に部分的に基づいて構築されたコンフォメーション的に拘束されたソマトスタチン類似体を、以下の実施例に提示する。以下の実施例は、該化合物の作製方法および使用方法ならびに本発明の方法を例示することを意図するものであり、限定として解釈されるべきではない。

#### 【 0 1 3 8 】



## 実施例

### 実施例1 PTR3173の詳細な合成法

5gのRinkアミド樹脂(NOVA)(0.56mmol/g)を、半融ガラスの底を備え、振とう器上に置いた反応容器の中で、N-メチルピロリドン(NMP)で膨潤させた。20%ピペリジンのNMP溶液との反応(10分間を2回、それぞれ25ml)により、Fmoc保護基を樹脂から除去した。Fmocの除去は290nmにおける紫外線吸収測定によってモニターした。Fmoc-Gly-C3(アリル)(3当量)、PyBrop(3当量)、DIEA(6当量)のNMP溶液(20ml)を用いて、室温で1時間、カップリングサイクルをおこなった。反応の完了は定性ニンヒドリン試験(カイザー(Kaiser)試験)によってモニターした。カップリングの後、ペプチド樹脂をNMPで洗浄した(25mlのNMPで2分間ずつ7回)。このペプチド樹脂を無水酢酸(キャップ形成混合物: HOBt 400mg、NMP 20ml、無水酢酸 10ml、DIEA 4.4ml)と室温で0.5時間反応させて、キャップ形成をおこなった。キャップ形成の後、上記のようにNMP洗浄(7回、それぞれ2分間)をおこなった。Fmocの除去を上記のようにおこなった。Fmoc-Phe-OHを同じ方法でカップリングして、Fmoc基を上記のように除去した。このペプチド樹脂を、上と同様のカップリング条件で、Fmoc-Thr(OtBu)-OHと反応させた。上記のようにFmoc除去をおこなった。同様のカップリング条件でFmoc-Lys(Boc)-OHをこのペプチド樹脂にカップリングした。カップリングの完了はFmoc試験によってモニターした(ペプチド樹脂のサンプルを取って重さを量り、Fmocを上記のようにして除去して、紫外線吸収を測定した)。上記のようにPyBropを用いて、Fmoc-D-Trp-OHをこのペプチド樹脂にカップリングした。Fmocを除去した後、同じ方法でFmoc-Trp-OHをカップリングした。Fmocを除去した後、Fmoc-Phe-OHを同じ方法でカップリングした。Fmocを除去した後、Fmoc-GABA-OHを同じ方法でカップリングした。Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>および5%酢酸、2.5%モルフォリンのクロロホルム溶液と、アルゴン気流下、室温で2時間反応させることによってアリル保護基を除去した。このペプチド樹脂を上記のようにNMPで洗浄した。20%ピペリジンのNMP溶液との反応(10分間を2回、それぞれ25ml)によってペプチドからFmoc保護基を除去した。3当量のPyBOP、6当量のDIEAのNMP溶液を用いて、室温で2時間燗化をおこなった。ペプチド樹脂を洗浄および乾燥した。94%TFA、2.5%水、2.5%EDT、1%TIS(ト

リイソプロピルシラン) と、アルゴン気流下で、0℃で15分間、および室温で2時間、反応させることによりペプチドを樹脂から切断した。混合物を冷エーテル(30ml、0℃) 中に入れて濾過し、樹脂を少量のTFAで洗浄した。濾液をロータリーエバポレーターに入れ、すべての揮発性成分を除去した。油状の生成物が得られた。これをエーテルによって摩砕してエーテルをデカンテーションすることを3回繰り返した。白色の粉末が得られた。この粗生成物を乾燥した。粗生成物の重さは4gであった。

#### 【 0 1 3 9 】

HPLCによる精製によって単一のピークが得られたが、これは、分析HPLCおよび毛管電気泳動によって、純度100%であることが検出された。質量分析によって、予想された通りの1123ダルトンの質量が検出された。

#### 【 0 1 4 0 】

#### 実施例 2 トリホスゲン法によるPTR3205合成の詳細な方法

2gのRink Amide (MBHA樹脂、NOVA、0.46mmol/g)を、半融ガラスの底を備え、振とう器に取り付けられた反応器の中でNMPで一晩膨潤させた。25%ピペリジンのNMP溶液(16ml)を用いて15分間で2回反応させることにより、Fmocを樹脂から除去した。NMP(10~15ml)で2分ずつ7回、注意深く洗浄した後、Fmoc-Phe-N<sub>3</sub>-OH(3当量、2.76mmol、1.46g)のNMP溶液(16ml)を用いて、PyBroP(2.76mmol、1.28g)およびDIEA(6当量、5.52mmol、0.95ml)によって室温で4分間活性化して、次いで反応器に移して室温で1時間カップリングをおこなってPhe-N<sub>3</sub>のカップリングを完了した。カップリングの後、このペプチド樹脂をNMP(10~15ml)で2分間ずつ7回洗浄した。反応の完了は定性ニンヒドリン試験(カイザー試験)によってモニターした。上記のようにFmocの除去および洗浄をおこなった後、THF(10~15ml)で2分間ずつ3回洗浄した。次いで、Fmoc-Cys(Acm)-OH(5当量、4.6mmol、1.9g)をBU-ペプチジル樹脂にカップリングするために、炭酸ビストリクロロメチル(1.65当量、1.518mmol、0.45g)およびコリジン(14当量、12.88mmol、1.7ml)のTHF(30-35ml、0.14M混合物を与える)溶液を用いて50℃で1時間反応させた。このカップリング工程を繰り返した。Thr、Lys、(D)Trp、Phe、CysおよびPheC<sub>3</sub>の構築を、それぞれFmoc-Thr(tBu)-OH、Fmoc-Lys(Boc)-OH、Fmoc-(D)Trp(Boc)-O

H、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Cys(Acm)-OHおよびFmoc-PheC3-OHを用いたカップリングサイクル（定性ニンヒドリン試験によってモニターした）を用いておこなった。それぞれのカップリングサイクルにおいて、アミノ酸をNMPに溶かし、PyBroPおよびDIEAによって活性化してカップリングをおこなった後、ペプチド樹脂を洗浄し、次いでFmocを除去した後、最初のカップリングについて上記したようにNMPでよく洗浄した。構築の最後に、ペプチジル樹脂に以下の条件でアリル/alloc脱保護をおこなった。すなわち、ペプチジル樹脂をDCM(10~15ml)で2分間ずつ3回、DCM-AcOH-NMM混合物(それぞれ92.5%、5%、2.5%)で2分間ずつ3回洗浄した。3gのPd(P(Ph)<sub>3</sub>)<sub>4</sub>を上記の混合物(80ml)に溶解し、得られた黄色の懸濁液を反応器に移してペプチジル樹脂との混合物を脱ガスし（反応器の半融ガラスの底を通してアルゴンの気泡を出すことによって）、次いで、遮光して2時間激しく振とうした。このペプチジル樹脂をDCM、CHCl<sub>3</sub>およびNMPによって洗浄した（2分間ずつ、合計15回）。PyBOP(3当量、2.76mmol、1.436g)およびDIEA(6当量、5.52mmol、0.95ml)のNMP溶液(20ml)を用いて、室温で1時間環化をおこなった後、2回目の環化を一晚（同じ条件で）おこなった。このペプチジル樹脂をNMPで洗浄した後、DMF-水(15ml、4:1)で2分間ずつ3回洗浄した。I<sub>2</sub>(5当量、4.6mmol、1.16g)のDMF-水(23ml、4:1)溶液をこのペプチジル樹脂に加えて、室温で40分間振とうし、Cys-Cys環化をおこなった。このペプチジル樹脂を濾過して、DMF/水、DMF、NMP、DCM、CHCl<sub>3</sub>およびまた2%アスコルビン酸DMF溶液を用いてよく洗浄した。最後のFmoc脱保護および上記の方法による洗浄およびさらにMeOHによる洗浄の後にペプチジル樹脂を減圧下で20分間乾燥し、次いで95%TFA、2.5%TISおよび2.5%水の合計30mlの反応混液混合物を用いてアルゴン気流下、0℃で30分間、次いで室温で1.5時間処理してペプチドを樹脂から切断した。溶液を抽出フィルターを通してポリプロピレン管に濾過し、樹脂を5~6mlの反応混液および4~5mlのTFAで洗浄し、溶液をN<sub>2</sub>気流によって蒸発させて油状残渣を得て、これを冷Et<sub>2</sub>Oによって処理して固体化した。遠心分離およびEt<sub>2</sub>O層のデカンテーションをおこない、さらに新たな冷Et<sub>2</sub>Oを加えて処理した後、遠心分離およびデカンテーションして、得られた白色の固体を減圧下で一晩乾燥して、粗PTR-3205-02(0.388g、30%)を得た。

## 【 0 1 4 1 】

実施例 3 生分解に対する抵抗性

SST環状ペプチド類似体、PTR3113、3123および3171のin vitroの生物安定性を、腎ホモジネート中で測定し、オクトレオチド (Octretide) (Sandostatin<sup>TM</sup>) および天然のソマトスタチン (SRIF-14) と比較した。結果を下の表 6 に示す。このアッセイにおいて、本発明の主鎖環化ペプチド類似体はオクトレオチドと同程度に安定であり、SRIFよりもはるかに安定であった。アッセイは、37℃の腎ホモジネート中でのペプチドの分解を時間の関数としてHPLCで測定した結果に基づく。

## 【 0 1 4 2 】

【 表 6 】

表 6 腎ホモジネート中でインキュベートした後の損なわれていない分子のパーセンテージ

時間 (時間)	SRIF	オクトレオチド	PTR-3113	PTR-3123	PTR-3171	PTR-3173
0	100	100	100	100	100	100
1	5	100	100	100	100	100
3	0	100	100	100	100	100
24	0	100	100	100	100	100

実施例 4 ソマトスタチン受容体への類似体の結合

ソマトスタチン類似体について、膜貫通型ソマトスタチン受容体 (SST-R1、2、3、4 または 5) を発現する膜調製物への<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SRIF (Raynorら、Molecular Pharmacology 43:838, 1993に記載された方法に基づく) の結合を阻害する能力を試験した。これらの試験に用いられた受容体調製物は、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に選択的且つ安定に発現されたクローン化されたヒト受容体、または天然にSST-Rを発現する細胞系のいずれかから得られたものである。典型的には、細胞膜をTris緩衝液中でプロテアーゼ阻害剤の存在下でホモジネートし、<sup>125</sup>I-Tyr<sup>11</sup>-SRIFと、さまざまな濃度の試験サンプルと共に30~40分間インキュベートした。結合反応物を濾過し、フィルターを洗浄して結合した放射線

活性をガンマ計数管で計数した。 $1\mu\text{M}$ のラベルされていないSRIF-14の存在下で結合したまま残っている放射線活性の値を、非特異的結合として定義した。

【 0 1 4 3 】

結合試験の陽性シグナルを有効とし、非特異的なシグナルを排除するために、同じ方法を用いて合成し処理された無関係のペプチドのサンプル、たとえばGnRHを陰性対照のサンプルとして同じアッセイで試験した。これらのサンプルはどのアッセイにおいても結合活性を持たなかった。結果を下の表7、8および9、および図1に示す。

【 0 1 4 4 】

【表7】

表7 主鎖環化類似体によるクローン化されたヒトソマトスタチン受容体3および5へのSRIF-14の結合の阻害のパーセンテージ

	SST-R3			SST-R5		
濃度	$10^{-9}\text{M}$	$10^{-7}\text{M}$	$10^{-6}\text{M}$	$10^{-9}\text{M}$	$10^{-7}\text{M}$	$10^{-6}\text{M}$
PTR-3113	16	65	94	0	50	86
PTR-3123	24	41	84	0	0	0
PTR-3171	12	40	87	18	10	60

計数の合計	12000 CPM	3600 CPM
非特異的結合	1200 CPM	900 CPM
ブランク	400 CPM	400 CPM

【表8】

表8 PTR 3173によるクローン化されたヒトソマトスタチン受容体へのSRIF-14の結合の阻害のパーセンテージ

	濃度(M)					
受容体サブ タイプ	$10^{-11}$	$10^{-10}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$
SST-R1	0	0	0	0	5	15
SST-R2	15	30	42	80	95	96
SST-R3	2	1	1	4	50	89
SST-R4	0	0	0	0	5	5
SST-R5	20	48	63	82	95	95

【表 9】

表 9 それぞれのクローン化されたヒトソマトスタチン受容体へのSRIFの結合を  
50%阻害するソマトスタチン類似体の濃度 (nM)

PTR	IC 50 (nM)			
	SST-R1	SST-R2	SST-R3	SST-R5
3201	$>10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
3203	$>10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-8}$
3197	$10^{-8}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$
3205	$>10^{-6}$	$10^{-9}$	$>10^{-6}$	$>10^{-6}$
3207	$10^{-7}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$	$10^{-8}$
3173	$>10^{-6}$	$10^{-9}$	$10^{-7}$	$10^{-9}$

## 【 0 1 4 5 】

実施例 5 好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体の *in vitro* の生体反応

A. 主鎖環化ソマトスタチン類似体 PTR3173 によるヒトカルチノイド BON-1 細胞に  
おける cAMP の阻害

SST-R5 の活性化はアデニル酸シクラーゼ活性の低下をもたらす。タイプ-5 受容  
体を含むソマトスタチン受容体は、ヒトカルチノイド由来細胞系 BON-1 に発現さ  
れる。このヒト細胞培養物を新規のカルチノイド治療法を発見するための *in vit*  
*ro* のアッセイとして利用した。ソマトスタチン類似体とこの系に発現されたソマ  
トスタチン受容体との相互作用は、その後に BON-1 の細胞機能に影響を与える。

本発明の好ましい主鎖環化類似体は、フォルスコリン(Forskolin)刺激の後のcAMP産生を阻害することが見いだされた。このシグナル伝達経路においてPTR3173は臨床的に使用される薬物のオクトレオチドと同等の効力を有する。

【 0 1 4 6 】

B. 主鎖環化ソマトスタチン類似体PTR3173によるin vitroの細胞増殖の阻害

ヒトクローン化SST-R5を発現するCHO細胞を利用して増殖阻害の薬理的評価をおこなった。細胞レベルでのPTR3173によるSST-R5の認識は、天然のホルモンおよび薬物のオクトレオチドと比較してかなり高い増殖阻害の効力と関連するものであった。

【 0 1 4 7 】

C. 主鎖環化ソマトスタチン類似体PTR3173によるクロモグラニンA放出の阻害

BON-1からのクロモグラニンAの放出の評価は、抗カルチノイド薬として使用可能なものを同定するための重要なアッセイである。クロモグラニンAは、カルチノイド腫瘍から過剰量の血管作動性の物質を分泌する腫瘍顆粒の脱顆粒における主要な仲介物質の1つである。PTR3173は、この経路に対して著しい抗放出効果を有する。ヒトBON-1アッセイにおける主鎖環化類似体に関する最も興味ある知見の一つは、これが天然のホルモンであるソマトスタチンと同等の効力を有することであり、これは、カルチノイド症候群に有益な作用を有する可能性を示している。

【 0 1 4 8 】

実施例 6 非ソマトスタチンG-共役型受容体への結合に関するPTR3173、オクトレオチドおよびSRIFの比較

ソマトスタチン受容体は7回膜貫通型G-タンパク質共役型受容体スーパーファミリーに属する。G-タンパク質共役型受容体は体に広く分布しており、アドレナリン、アセチルコリン、オピエート、ニューロキニン、ガストリン、および他の多くのホルモンのようなさまざまなホルモンの生理活性を仲介する。薬物の候補はファミリー内の受容体の特定のサブタイプによって認識され得る。けれども、これはそのファミリーとは異なる他の受容体を認識することによって体内で有害な作用を起こす可能性がある。これを考慮すると生理的選択的薬物を開発する際

の、受容体内に対する受容体間の選択性の重要性が増大した。

【 0 1 4 9 】

NovaScreen(Hanover, MD)によって、さまざまなG-タンパク質共役型受容体ファミリーへの非特異的結合の評価をおこなった。ニューロキニン、オピエートおよびムスカリン性受容体への結合の研究は、天然ホルモンのソマトスタチン、オクトレオチドおよびPTR3173の間の比較に基づいていた。NovaScreenによって行われたスクリーニングアッセイにおいて、オクトレオチドのオピエート受容体への有意に高い親和性が見いだされた一方、同じ実験条件下でPTR3173および天然ホルモンのソマトスタチンはこれらの受容体に結合しなかった(図2)。PTR3173および天然ホルモンよりも有意に高いオクトレオチドの親和性は、ムスカリン性-2受容体に対しても見いだされた。

【 0 1 5 0 】

オクトレオチドのオピエート受容体への交差反応性結合の重要性について、さらにモルモット回腸で研究した。予備試験の結果により、オクトレオチドのオピエートアンタゴニストとしての効果が確認されるが、同じ実験条件下でPTR3173はmet-エンケファリン-誘発引っ張り収縮(twitch contraction)に影響を与えなかった。

【 0 1 5 1 】

実施例 7 受容体特異的主鎖環化ソマトスタチン類似体の成長ホルモン放出に対するin vivoの効果

方法：

ペプチドの投与の結果としての成長ホルモン(GH)放出の阻害をオスのWistarラットを用いて測定した。この研究において、それぞれの群に4匹のラットを用いて、類似体の活性をSRIFまたはオクトレオチドと比較した。

【 0 1 5 2 】

体重200~250gの成熟したオスのWistarラットを一定の明暗周期(8:00から20:00まで明るくする)、温度(21±3℃)、および相対湿度(55±10%)で飼育した。研究室用飼料および水道水を随意に与えた。実験の日に、ラットをネンブタール(腹腔内投与、60mg/kg)で麻酔した。麻酔の10分後に、薬物を0.01~100μg/kg



の用量で皮下投与した。0.5g/kgのL-アルギニンを大腿静脈から静脈内投与することによってGHの刺激をおこなった。刺激の5分後、ペプチド投与の15または30分後にサンプリングをおこなった。血液サンプルを腹部大静脈からヘパリン(血液1mlあたり15ユニット)の入った管に集めてすぐに遠心分離した。血漿を分離してアッセイまで-20℃で冷凍保存した。ラット成長ホルモン(rGH)の $[^{125}\text{I}]$ レベルを、ラジオイムノアッセイキット(Amersham)によって測定した。このキットにおける標準を、糖尿病ならびに消化器および腎臓病国立研究所(the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases)より入手した参照標準調製物(NIH-RP2)に対して補正した。すべてのサンプルを2回測定した。これらの実験の結果を図3に示す。

#### 【 0 1 5 3 】

##### 結果：

ラットにおいて、ネンプタールで麻酔した状態でL-アルギニンを静脈内にボラス投与することによって成長ホルモンの放出が刺激された。このモデルにおける報告されたオクトレオチドのED50(Bauerら、前掲)は、およそ0.1 $\mu\text{g/kg}$ である。そこで、オクトレオチドおよび試験した受容体特異的主鎖環化類似体を100 $\mu\text{g/kg}$ の比較的高い用量で投与した。これらの実験条件下で、PTR-3205およびPTR3173は、オクトレオチドと比較して同等の効力を有する成長ホルモン放出阻害剤であった(図3)。受容体5特異的類似体であるPTR-3201について興味ある結果が得られた。この選択的類似体は成長ホルモンの放出に影響を与えず、それによって、成長ホルモンの阻害はソマトスタチン受容体サブタイプ5によって仲介されないことが実証された。他方、受容体サブタイプ2に選択的であるPTR-3205で見いだされた有意な阻害は、これが成長ホルモンの阻害を仲介する主要な受容体であることを示している。したがって、薬物オクトレオチドまたはPTR3173に見いだされた成長ホルモンに対する効果はこれらが受容体サブタイプ2を認識するためであると推定できる。

#### 【 0 1 5 4 】

オクトレオチドと比較したPTR3132によるGH阻害の追加的な結果を表10に記載する。

## 【 0 1 5 5 】

## 【 表 1 0 】

表10 血漿成長ホルモン濃度 (ng/ml)

	対照	なし	オクトレオチド	PTR-3123
	1.03		0.48	10
	10	0.46	0.56	6.37
	10	2.7	0.46	7.4
	10	4.54	0.43	10
	10		0.43	10
	10		0.61	10
平均	8.72	2.33	0.50	8.96
SE	1.28	0.87	0.03	0.67

## 【 0 1 5 6 】

実施例 8 受容体特異的主鎖環化ソマトスタチン類似体のグルカゴン放出に対する *in vivo* の効果

ペプチド投与の結果としてのグルカゴンの放出を、オスのWistarラットを用いて *in vivo* で測定した。この研究において、それぞれの群に4匹のラットを用いて、類似体の活性をSRIFまたはオクトレオチドと比較した。一定の実験条件下でのグルカゴンの放出の時間経過を測定した。

## 【 0 1 5 7 】

オスのWistarラットを一晩絶食させた。動物をネンブタール（腹腔内投与、60 mg/kg）によって麻酔した。麻酔の10分後に薬物を0.01~100  $\mu$ g/kgの用量で皮下投与した。グルカゴン分泌の刺激は、0.5g/kgのL-アルギニンの静脈内投与によっておこない、その5分後に門脈から血液を集めた。RIAによってホルモン濃度を測定した。

## 【 0 1 5 8 】

対照と比較してグルカゴンレベルに統計的な有意差が得られたのは、PTR3173

を100  $\mu$ g/kgの高用量で投与した場合のみで(図4)、成長ホルモン放出に対するPTR3173のED50と比較して1000倍高い用量であった。これらの結果は、上の表4にまとめたように、オクトレオチドと比べてこの主鎖環化類似体が顕著な生理的選択性を有することを強調している。

# 【 0 1 5 9 】

オクトレオチドと比較したPTR3132によるグルカゴン阻害の追加的な結果を表11に記載する。

# 【 0 1 6 0 】

【表 1 1】

表11 血漿グルカゴン濃度 (ng/ml)

	対照	なし	オクトレオチド	PTR-3123
	189	18	20	58
	76	9.5	89	52
	145	32	62	20
	37	20	70	84
	131		37	87
	44		20	20
	67			
平均	98.4	19.9	49.7	53.5
SE	21.6	4.6	11.6	12.0

# 【 0 1 6 1 】

実施例 9 受容体特異的主鎖環化ソマトスタチン類似体のインシュリンの放出に対する *in vivo* の効果

ソマトスタチン類似体によるインシュリン放出の阻害は、文献によく記載されている(Bauerら、前掲、Lambertら、1996、前掲)。けれども、長時間の生理活性を有する合成ソマトスタチン類似体は、その成長ホルモンまたはグルカゴン放出

の阻害能力に比べて、インシュリンに対しては活性がより小さいことが報告されている (Bauerら、前掲、Lambertsら、1996、前掲)。Sandozは、オクトレオチドにはインシュリンに対して成長ホルモンに生理的選択性があると主張した。けれども、2型糖尿病において、長時間作用する類似体オクトレオチドはインシュリンおよびグルカゴンの放出を抑制して、グルコースのレベルを変化させないか、またはいくらか上昇させる。

#### 【 0 1 6 2 】

他の臨床的な試験によって、オクトレオチドがそのグルカゴンおよび成長ホルモンを低下させる能力にも関わらず2型糖尿病において血糖値を低下させることができないのは、おそらくその投与によって誘導される残余の内因性インシュリン分泌の一時的遮断によるものであることが示された。健康な被験体において、オクトレオチドの投与は、穏やかな空腹時高血糖症および著しい空腹時低インスリン血症 (hypoinsulinemia) の発達をもたらした。さらに、オクトレオチドは、膵臓からのインシュリンの過剰な放出を伴う症候群である、島細胞症の治療用に処方されるが、これはオクトレオチドのインシュリンに対する非特異的な生理作用を強調するものである (Kaneら、J. Clin. Invest. 100:1888, 1997)。

#### 【 0 1 6 3 】

受容体特異的主鎖環化ソマトスタチン類似体のインシュリン放出に対する生理作用を評価するために、Sandozがオクトレオチドの評価のために用いたものと同じ実験プロトコールを実施した。インシュリンの刺激は、一晚絶食したラットへのD-グルコースの静脈内ボラス投与によって誘導された。

#### 【 0 1 6 4 】

##### 方法：

ペプチド投与の結果としてのインシュリン放出を、オスのWistarラットを用いてin vivoで測定した。この研究において、それぞれの群に4匹のラットを用いて、類似体の活性をSRIFまたはオクトレオチドと比較した。一定の実験条件下におけるGH放出の時間経過を測定した。

#### 【 0 1 6 5 】

オスのWistarラットを一晩絶食させた。動物をネンブタール (腹腔内投与、60m

g/kg)で麻酔した。麻酔の10分後に、薬物を0.01~100  $\mu$ g/kgの用量で皮下投与し、その30分後に0.5g/kgのD-グルコースの静脈内投与によってインシュリン分泌の刺激をおこない、その5分後に血液を腹部の大静脈から集めた。ホルモンレベルをRIAによって測定した。

#### 【 0 1 6 6 】

##### 結果：

PTR-3205およびオクトレオチドはどちらもインシュリン放出の活性な阻害剤である(図5a)。皮下注射後のオクトレオチドのED50は10~100  $\mu$ g/kgの間で、Sandozによって報告されたED50である26  $\mu$ g/kgと一致していた。PTR-3205に見いだされた有意な効果は、ソマトスタチン受容体サブタイプ2が成長ホルモンおよびまたインシュリンに対する効果をも仲介することを示している。この受容体-エフェクター関係は、ソマトスタチンが単離され灌流されたヒト膵臓において受容体サブタイプ2を介した $\beta$ -細胞の分泌を阻害することを示した、先に公表されたデータと相関していた。PTR-3205およびオクトレオチドで見いだされた有意な効果とは対照的に、高用量(100  $\mu$ g/kg)のPTR-3201およびPTR3173はインシュリンに対して不活性であった。同様の用量のPTR3173は成長ホルモンの放出に対しては有意な効果を有していたことに留意しなければならない。この興味深いPTR3173の生理的選択性のため、本発明者らはこの実験を、1mg/kgまでのはるかに高い用量を用いて繰り返した。これらの実験条件下で、PTR3173は薬物オクトレオチドと比較してインシュリンに対しては容易に感知できる効果を持たない生理的に選択的なソマトスタチン類似体であると定義された(図5b)。

#### 【 0 1 6 7 】

オクトレオチドと比較したPTR3132によるグルカゴン阻害の追加的な結果を表12に記載する。

#### 【 0 1 6 8 】

##### 【表 1 2】

表12 血漿インシュリン濃度(ng/ml)

	対照	なし	オクトレオチド	PTR-3123
	3.97	1	3.5	1.46
	4.14	2.5	1.95	5.66
	5.12	0.7	3.7	
	3.8	0.74	3.06	2.44
	2.7		2	1.87
	3		1.1	2.8
	1.5			
平均	3.46	1.24	2.55	2.85
SE	0.44	0.43	0.42	0.74

## 【 0 1 6 9 】

実施例10 その他の好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体

合成されたその他の好ましいソマトスタチン類似体を表13および14に記載する

。

## 【 0 1 7 0 】

## 【 表 1 3 】

表13 その他のソマトスタチン類似体

PTR番号	配列
3102	NMeAla-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Phe(C3)-NH <sub>2</sub>
3135	(D)Phe-Phe-Phe(N2)-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3137	(D)Phe(N2)-Phe-Phe(C3)-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-NH <sub>2</sub>
3139	H-(D)Phe-Ala(N3)-Phe-(D)Trp-Lys-Phe-Ala(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3141	(D)Nal-Gly(S2)*-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys*-Thr-NH <sub>2</sub>
3143	Phe(C1)-Phe-(D)Trp-Lys-(D)Thr-Phe(N2)-NH <sub>2</sub>
3145	Phe-Phe-His-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3147	Ala-Phe-His-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3153	(D)Ala-Phe-His-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3155	(D)Phe-Phe-His-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3157	Aib-Phe-His-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-NH <sub>2</sub>
3161	(D)Phe-Orn*-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Phe(C3)-Thr-OL
3163	(D)Phe-Phe(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-DAP*-Thr-OL
3165	(D)Phe-Phe(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Lys*-Thr-OL
3187	Phe(C1)-Phe-Leu-(D)Trp-(D)Lys-Phe(N2)-NH <sub>2</sub>
3189	H-Ala(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Phe-Ala(C3)-Thr-NH <sub>2</sub> ; 架橋-ピペラジン
3191	H-Ala(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Phe-Ala(C3)-Thr-NH <sub>2</sub> 架橋-1,2ジアミノシクロヘキサン
3193	H-Ala(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Phe-Ala(C3)-Thr-NH <sub>2</sub> 架橋-m-キシレンジアミン
3195	H-Ala(C3)-Phe-(D)Trp-Lys-Phe-Ala(C3)-Thr-NH <sub>2</sub> 架橋-エチレンジアミン

星印は、アミノ酸のN<sup>\*</sup>- $\omega$ -官能化誘導体と印を付けた残基の側鎖の間に架橋基が連結していることを示す。

#### 【 0 1 7 1 】

最後の4つの類似体(PTR3189、3191、3193、および3195)では、二つの同一のビルディング単位が、表に示される異なるジアミン架橋によって連結されている。

#### 【 0 1 7 2 】

#### 【 表 1 4 】

表14 その他のソマトスタチン類似体

SRIF配列における位置							
5	6	7	8	9	10	11	12
	Phe*	Phe	(D) Trp	Lys	Thr	Phe (C2)	
		Phe*	(D) Trp	Lys	Thr	Phe (C2)	
		Phe*	(D) Trp	(D) Lys	Thr	Phe (C2)	
		Ala (C1)	(D) Trp	Lys	Ala (N2)	Phe	
		Ala (C1)	(D) Trp	Lys	Thr	Phe (N2)	
		Ala (C1)	(D) Trp	Lys	Thr	Ala (N2)	
	Ala (C1)	Phe	(D) Trp	Lys	Thr	Ala (N2)	
	Ala (C1)	Tyr	(D) Trp	Lys	Val	Phe (N2)	
	Ala*	Phe	(D) Trp	(D) Lys	Thr	Ala (N2)	
(D) Phe	Ala (C1)	Phe	(D) Trp	Lys	Ala (N2)		
		Ala*	(D) Trp	Lys	Thr	Ala (C2)	
		Ala (S2)	(D) Trp	Lys	Thr	Cys	
		Ala (S2)	(D) Trp	Lys	Thr	Cys	Thr-O1
	Ala (S2)	Phe	(D) Trp	Lys	Cys		
	Ala (S2)	Phe	(D) Trp	Lys	Thr	Cys	Thr-O1

星印は、アミノ酸のN<sup>α</sup>-ω-官能化誘導体とペプチドのN末端の間に架橋基が連結していることを示す。PTR3965およびPTR3975の12位のThr残基は好ましくは末端アルコール基に還元されている。

#### 【 0 1 7 3 】

#### 実施例11 SH-ビルディング単位を含むその他の好ましい主鎖環化ソマトスタチン類似体

少なくとも1つのSH-型ビルディング単位を含むその他の好ましい類似体、およびそのSST-Rに対する結合親和性を表12に記載する。それぞれのPTR配列中の星印は、環化の位置を示す。架橋基は、印を付けたアミノ酸のN<sup>α</sup>-ω-官能化誘導体ともう一つの印を付けたアミノ酸のN<sup>α</sup>-ω-S-官能化誘導体、Cys残基の側鎖、または他のSH-部分の間に連結している。

#### 【 0 1 7 4 】



【表 15】

表 15 SH-型ビルディング単位を含むその他の好ましい類似体

PTR	配列	SST-Rに対するIC <sub>50</sub> (nM)			
		1	2	3	5
3159	Fmoc-Gly(S1)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OL				
3167	(D)Phe-Gly(S1)-(D)Trp-Lys-Thr-Cys*-Thr-OL				
3169	Gly(S1)-(D)Trp-Lys-Thr-Cys*-Thr-OL				
3175	Phe(S4)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys*-Thr-NH <sub>2</sub>				
3177	Phe(S4)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys*-Trp-NH <sub>2</sub>				
3179	Fmoc-Gly(S1)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys*-Thr-NH <sub>2</sub>				
3181	Fmoc-Gly(S1)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys*-Trp-NH <sub>2</sub>				
3197	Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	1000	4	40	1
3207	(D)Phe-Cys*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	>333	1-12		4
3211	メルカプト酢酸(*)-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	333	37	12-37	1.3
3213	Gly(S2)*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	333	4	333	12
3217	3-チオプロパン酸*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	>333	37	100	4.1
3219	(D)Phe-Gly(S2)*-Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	>333	4	333	37
3221	(D)Nal-Gly(S2)*-Phe-Trp-(L)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)*-NH <sub>2</sub>	>333	12	333	111

本明細書において、本発明をいくつかの非限定的な実施例によって例証した。好ましい実施形態に対して、特許請求の範囲から解釈される発明の範囲を逸脱することなく、さらに多くの修正および変更が可能であることは当業者には明らかであろう。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

図 1 は、PTR-3173による、5種のヒトクローン化ソマトスタチン受容体へのSRI F結合の阻害率(%)を示すグラフである。

## 【図 2】

図 2 は、種々のGタンパク質共役型受容体へのソマトスタチン類似体(100nMの濃度で試験を行った)の非特異的結合を示すグラフである。

## 【図 3】

図 3 は、オクトレオチドと比較した、成長ホルモンの放出に対する本発明のソマトスタチン類似体の作用を示すグラフである。

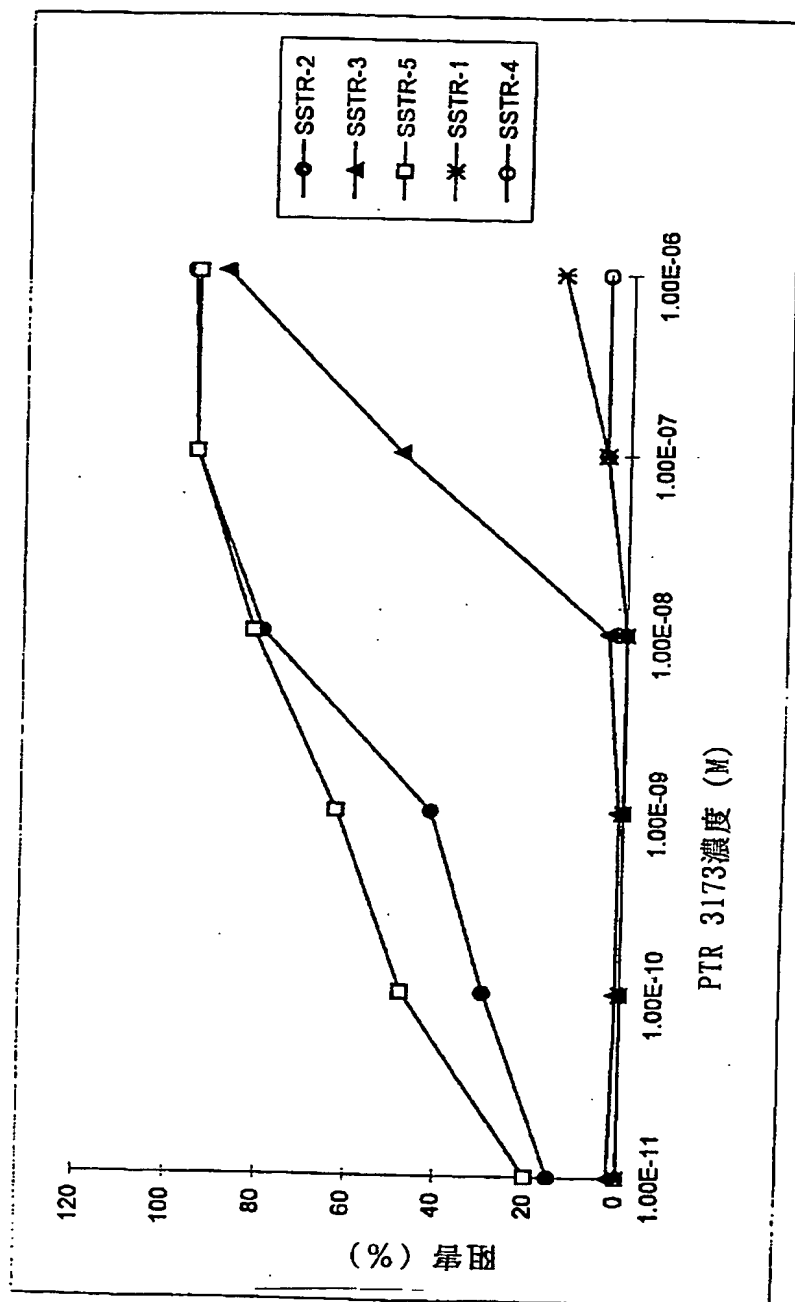
## 【図 4】

図4は、グルカゴン放出に対する本発明のソマトスタチン類似体の用量応答作用を示すグラフである。

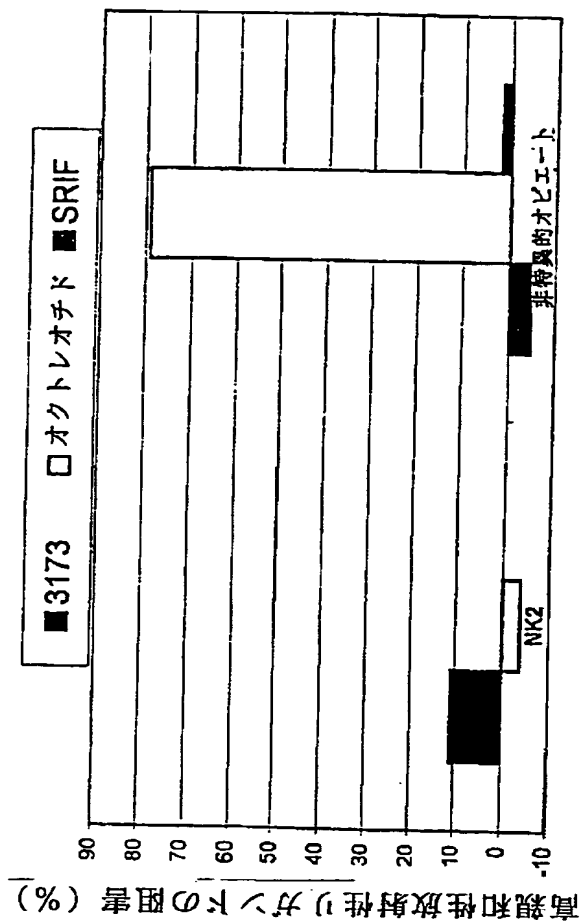
【図5】

図5aおよび5bは、3つの異なる実験において、オクトレオチドと比較したインシュリン放出に対する本発明のソマトスタチン類似体の作用を示すグラフである。

【 図 1 】

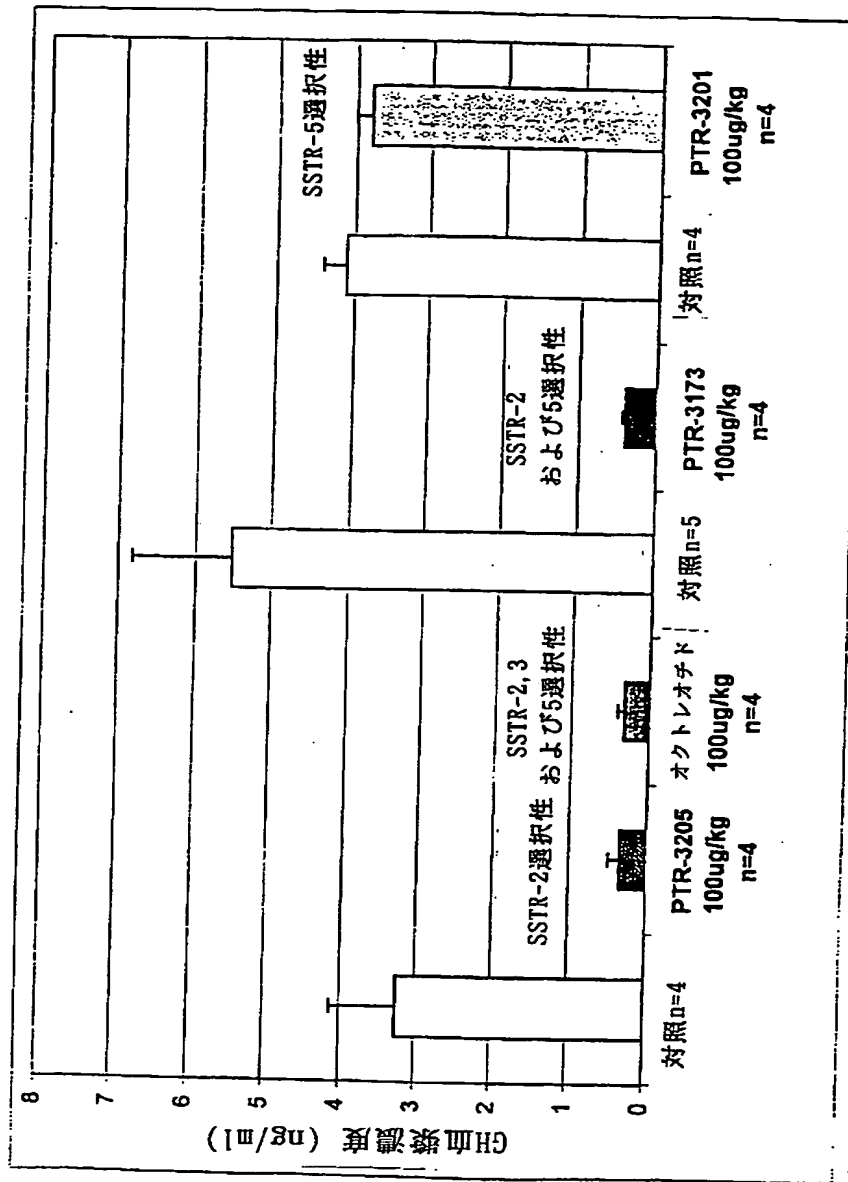


【 図 2 】

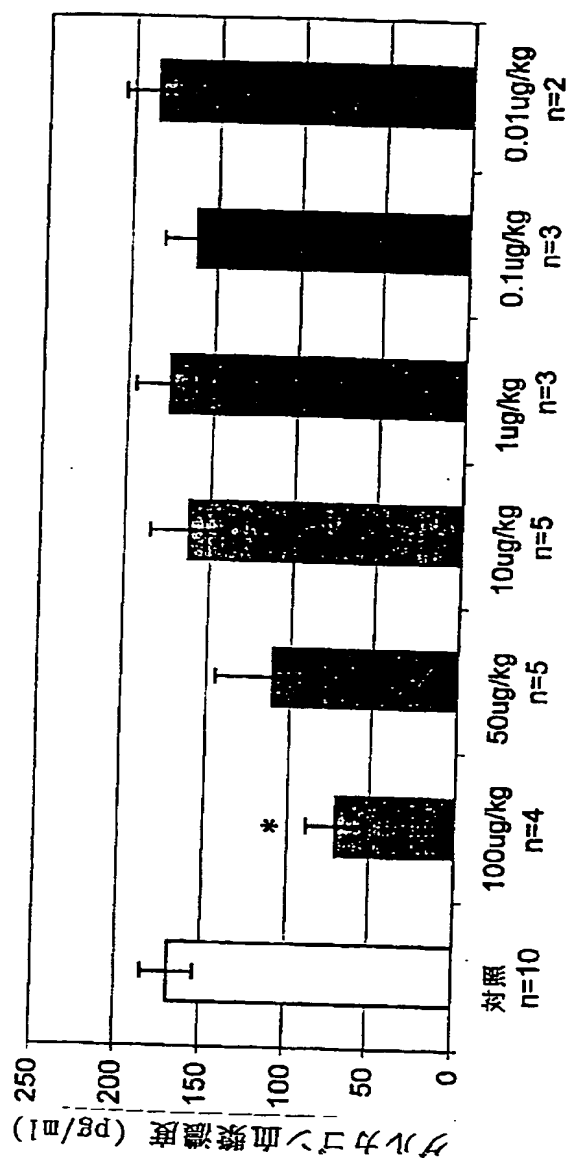


Gタンパク質共役型受容体サブタイプ

【 図 3 】



【 図 4 】

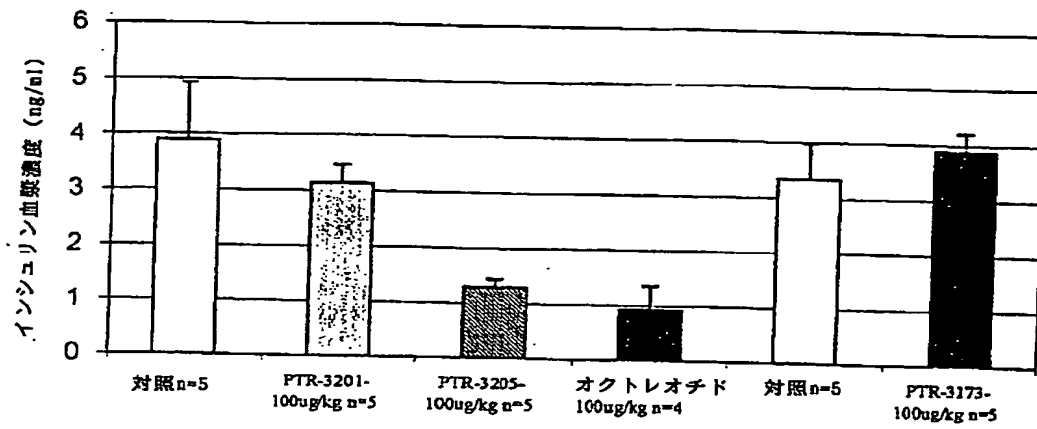


PTR-3173

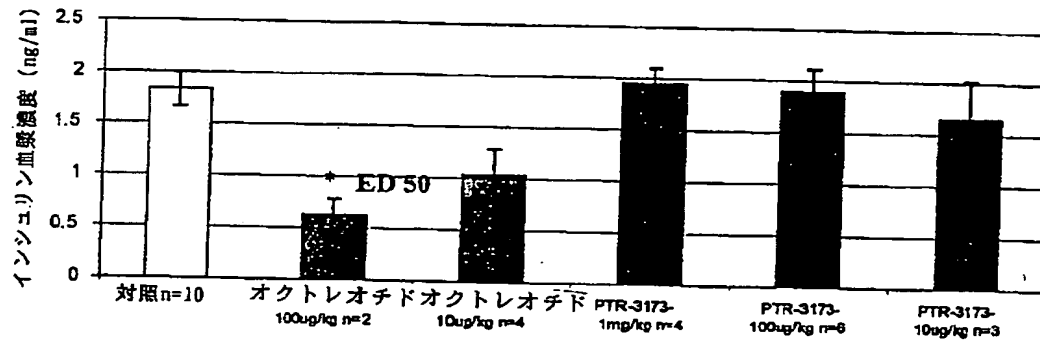
\* $p < 0.05$  Dunnett  $\pm$  S.E.

【 図 5 】

A.



B.



\*P&lt;0.05 Dunnett ± S.E

## 【手続補正書】

【提出日】平成13年1月19日(2001. 1. 19)

## 【手続補正1】

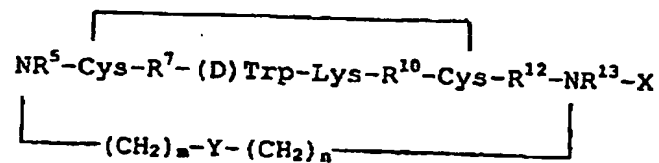
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項19

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【請求項19】 下記の一般式15



式15

[式中、mおよびnは、1～5であり、

Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

R<sup>5</sup>は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、R<sup>7</sup>は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1Nal、(D)-もしくは(L)-2Nal、またはTyrであり、R<sup>10</sup>は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、R<sup>12</sup>は、Gly、Val、(D)-もしくは(L)-Pheであるか、または存在せず、R<sup>13</sup>は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

Yは、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

## 【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項20

【補正方法】変更



## 【補正内容】

【請求項20】  $R^5$  が Phe であり、

$R^7$  が Phe であり、

$R^{10}$  が Thr であり、

$R^{12}$  が Gly、Val、(D)-もしくは(L)-Pheであるか、または存在せず、

$R^{13}$  が Phe であり、

Yがアミドである、請求項19に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

## 【手続補正3】

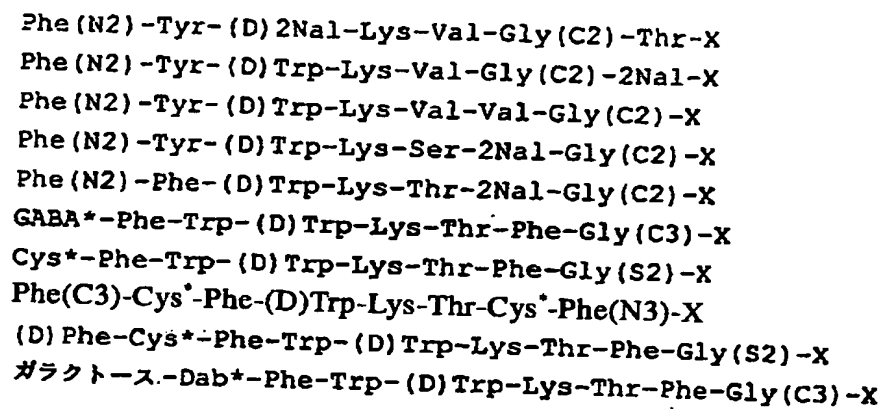
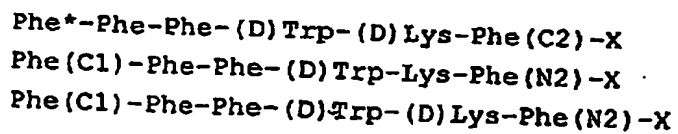
【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項21

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【請求項21】 下記式



[式中、Xは、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、星印(\*)は、架橋基がアミノ酸の $N\alpha-\omega$ -官能化誘導体とペプチドのN末端もしくはCys残

基の側鎖の間に結合していることを示す]

を有する、請求項1に記載の主鎖環化ソマトスタチン類似体。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正内容】

【0030】

【表1】

本発明の最も好ましい類似体

PTR	配列	SST-R
3171	Phe <sup>*</sup> -Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(C2)-X	
3113	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-Lys-Phe(N2)-X	3
3123	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(N2)-X	3
3209	Phe(N2)-Tyr-(D)2Nal-Lys-Val-Gly(C2)-Thr-X	1
3183	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Gly(C2)-2Nal-X	5
3185	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Val-Gly(C2)-X	5
3201	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Ser-2Nal-Gly(C2)-X	5
3203	Phe(N2)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-2Nal-Gly(C2)-X	3,5
3173	GABA <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X	2,5
3197	Cys <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X	3
3205	Phe(C3)-Cys <sup>*</sup> -Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys <sup>*</sup> -Phe(N3)-X	2
3207	(D)Phe-Cys <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X	2,3
3229	2Nal-Dab <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X	

ここで、Xは-NH<sub>2</sub>または-OHであり、架橋基は2つのビルディング単位の間、または以下に示すように延びている：

PTR 3171およびPTR 3173については、星印は、架橋基がN $\alpha$ - $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体と、該ペプチドのN末端との間に結合することを示す。PTR 3197およびPTR 3207については、星印は、架橋基がN $\alpha$ - $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体と、Cys残基の側鎖との間に結合していることを示す。PTR 3205は、2つのビルディング単位（Phe-C3およびPhe-N3）を1つの架橋が連結し、2つ目の架橋が2つのCys残基間に形成されるジスルフィド架橋である、二環式化合物である。SST-Rは、各

類似体が選択性を有するソマトスタチン受容体サブタイプを示す

これらの主鎖環化ソマトスタチンペプチド類似体は、少なくとも1つの $N\alpha-\omega$ -官能化アミノ酸誘導体をペプチド配列中に組み込み、次いで、ペプチド配列中の1つのアミノ酸側鎖を有するか、または他の $\omega$ -官能化アミノ酸誘導体を有する官能基を選択的に環化することにより調製する。該 $N\alpha-\omega$ -官能化アミノ酸誘導体は、好ましくは以下の式1を有する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

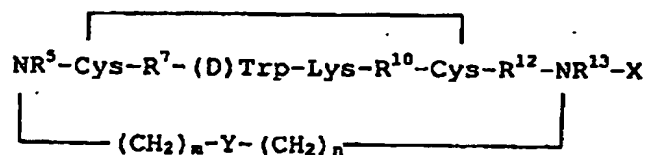
【補正対象項目名】0097

【補正方法】変更

【補正内容】

【0097】

別のより好ましい実施形態は、下記の一般式：



式15

[式中、 $m$ および $n$ は、1～5であり、

$X$ は、末端カルボン酸基、アミド基またはアルコール基を表し、

$R^5$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、

$R^7$ は、(D)-もしくは(L)-Trp、(D)-もしくは(L)-Phe、(D)-もしくは(L)-1NaI、(D)-もしくは(L)-2NaI、またはTyrであり、

$R^{10}$ は、Thr、Gly、Abu、Ser、Cys、Val、(D)-もしくは(L)-Ala、または(D)-もしくは(L)-Pheであり、

$R^{12}$ は、Gly、Val、(D)-もしくは(L)-Pheであるか、または存在せず、

$R^{13}$ は、(D)-もしくは(L)-Pheまたは(D)-もしくは(L)-Alaであり、そして

$Y$ は、アミド、チオエーテル、チオエステルまたはジスルフィドである]

を有する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0098

【補正方法】変更

【補正内容】

【0098】

好ましくは、

R<sup>5</sup>はPheであり、

R<sup>7</sup>はPheであり、

R<sup>10</sup>はThrであり、

R<sup>12</sup>はGly、Val、(D)-もしくは(L)-Pheであるか、または存在せず、

R<sup>13</sup>はPheであり、そして

Yはアミドである。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0102

【補正方法】変更

【補正内容】

【0102】

【表3】

最も好ましい類似体

PTR	配列
3171	Phe <sup>*</sup> -Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(C2)-X
3113	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-Lys-Phe(N2)-X
3123	Phe(C1)-Phe-Phe-(D)Trp-(D)Lys-Phe(N2)-X
3209	Phe(N2)-Tyr-(D)2Nal-Lys-Val-Gly(C2)-Thr-X
3183	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Gly(C2)-2Nal-X
3185	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Val-Gly(C2)-X
3201	Phe(N2)-Tyr-(D)Trp-Lys-Ser-2Nal-Gly(C2)-X
3203	Phe(N2)-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-2Nal-Gly(C2)-X
3173	GABA <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X
3197	Cys <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X
3205	Phe(C3)-Cys <sup>*</sup> -Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys <sup>*</sup> -Phe(N3)-X
3207	(D)Phe-Cys <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(S2)-X
3229	ガラクトース-Dab <sup>*</sup> -Phe-Trp-(D)Trp-Lys-Thr-Phe-Gly(C3)-X

式中、Xは-NH<sub>2</sub>または-OHであり、2つのビルディング単位、すなわち下記のものの間には架橋基が伸びている。PTR 3171およびPTR 3173については、星印(\*)は、架橋基がアミノ酸のN $\alpha$ - $\omega$ -官能化誘導体とペプチドのN末端との間に結合していることを示す。PTR 3197およびPTR 3207については、星印は、架橋基がアミノ酸のN $\alpha$ - $\omega$ -官能化誘導体とCys残基の側鎖との間に結合していることを示す。PTR 3205は二環式化合物であり、第1の架橋は2つのビルディング単位(Phe-C3およびPhe-N3)を繋ぎ、第2の架橋は2つのCys残基間で形成されるジスルフィド架橋である。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL99/00529

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : A61K 38/04, 38/12; C07K 7/64 US CL : 514/9, 11, 15, 16; 530/311, 317, 328 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/9, 11, 15, 16; 530/311, 317, 328 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, STN search terms: backbone cyclized, somatostatin, backbone to backbone		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X — A	US 5,811,392 (GILON et al) 22 September 1998, see entire document.	1 — 19-20, 22-40
P, X — Y	US 5,770,687 (HORNIK et al) 23 June 1998, see entire document.	1, 22, 35 — 7-14, 25-28, 36-40
X — A	WO 97/09344 A2 (PEPTOR LIMITED) 13 March 1997, See entire document.	1, 22, 35 — 2-21, 25-28, 36-40
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 AUGUST 1999		Date of mailing of the international search report 09 SEP 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer ANISH GUPTA Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL99/00329

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GILON et al. Backbone Cyclization: A New Method for Conferring Conformational Constraint on Peptides. Biopolymers. 1991. Vol. 31. pages 745-750.	1-40
A	BYK et al. Building units for N-Backbone Cyclic Peptides. I. Synthesis of Protected N-( -Aminoalkylene)amino Acids and Their Incorporation into Dipeptide units. Journal of Organic Chemistry. 1992. Vol. 57. pages 5687-5692.	1-40

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード' (参考)
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 43/00	1 1 1
43/00	1 1 1	A 6 1 K 37/02	
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		